

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Marco Bijuk

**OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE ULJA IZ SJEMENKI GROŽĐA
SUPERKRITIČNIM CO₂ PRIMJENOM METODE ODZIVNIH POVRŠINA**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, kolovoz, 2015.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za projektiranje tehnoloških procesa i konstrukcijske materijale
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Tehnološko projektiranje**Tema rada** je prihvaćena na VII. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. travnja 2015. godine.**Mentor:** doc. dr. sc. *Stela Jokić***Komentor:** doc. dr. sc. *Maja Molnar***Pomoć pri izradi:** dr. sc. *Krunoslav Aladić***OPTIMIZACIJA PROCESA EKSTRAKCIJE ULJA IZ SJEMENKI GROŽĐA SUPERKRITIČNIM CO₂ PRIMJENOM
METODE ODZIVNIH POVRŠINA***Marco Bijuk, 232-DI***Sažetak:**

Republika Hrvatska raspolaže velikim površinama pod vinogradima. Za područje Slavonije i Baranje proizvodnja vina predstavlja vrlo važnu gospodarsku djelatnost. Pri toj proizvodnji vina nastaje prilična količina komine kao vrijednog nusprodukta, koja se u današnje vrijeme uglavnom upotrebljava kao gnojivo u vinogradima. Cilj ovog rada bio je iskoristiti otpad od proizvodnje vina s posebnim naglaskom na sjemenkama grožđa i na novim zelenim tehnologijama. Kao „zeleno“ otapalo u ekstrakciji ulja iz sjemenki grožđa primjenio se superkritični CO₂ koji se pokazao kao vrlo poželjno otapalo u separacijskim procesima budući da je neotrovan, nezapaljiv, bez okusa i mirisa, jeftin i lako dostupan u većim količinama, zbog toga što je ekološki prihvatljivo i GRAS (generalno prihvaćen kao sigurno) otapalo. Ispitan je utjecaj različitih procesnih parametara ekstrakcije ulja iz sjemenki grožđa primjenom superkritičnog CO₂ na prinos kao i na antioksidacijska svojstva dobivenih ulja te udio biaktivnih komponenata. Optimiranje procesa ekstrakcije groždanog ulja provedeno je metodom odzivnih površina uz primjenu programa *Design Expert*[®]. Ulje dobiveno ekstrakcijom superkritičnim CO₂ se osim kao dijetetski proizvod može koristiti i u kozmetičkoj industriji. Također, nakon procesa ekstrakcije ulja iz sjemenki grožđa zaostaje i odmašćeno brašno koje se dalje može koristiti u druge svrhe (u proizvodnji obogaćenih ekstrudiranih proizvoda, itd.).

Ključne riječi: Sjemenke grožđa, ulje, ekstrakcija superkritičnim fluidima, optimizacija**Rad sadrži:** 56 stranica
17 slika
13 tablica
0 priloga
84 literaturne reference**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Mate Bilić</i> | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. <i>Stela Jokić</i> | član-mentor |
| 3. doc. dr. sc. <i>Maja Molnar</i> | član-komentor |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Lidija Jakobek</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 31. kolovoza, 2015.**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Process Design and Construction Materials
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program Food Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Technological Design

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. VII. held on April 28, 2015.

Mentor: *Stela Jokić*, PhD, assistant prof.

Co-Mentor *Maja Molnar*, PhD, assistant prof.

Technical assistance: *Krunoslav Aladić*, PhD

EXTRACTION OPTIMIZATION OF GRAPE SEED OIL WITH SUPERCRITICAL CO₂ USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

Marco Bijuk, 232-DI

Summary:

The Republic of Croatia has large areas under vineyards. For Slavonia and Baranja area wine production represents an important economic activity. During wine production a considerable amount of pomace as a valuable by-product occurs, which is nowadays mainly used as a fertilizer in the vineyards. The aim of this study was to use waste from the wine production process with special accent on grape seeds and new green technologies. Supercritical CO₂ was used as a green solvent in extraction of grape seed oil and it has already been proven to be a highly desirable solvent in the separation processes, since it is non-toxic, non-flammable, tasteless, no smell, inexpensive, readily available in large quantities, because it is environmentally friendly and GRAS (generally recognized as safe) solvent. The effects of different extraction process parameters were investigated. The extraction yield, antioxidant activity and the content of bioactive compounds of obtained oils were determined. Extraction optimization was conducted using response surface methodology (RSM). Extracted oil can be further used not only like dietary product while also in the cosmetic industry. Furthermore, defatted grape flour resulting from the supercritical extraction of grape oil could be also used for other purposes (in the production of enriched extruded products, etc.).

Key words: Grape seeds, oil, supercritical fluid extraction, optimization

Thesis contains: 56 pages
17 figures
13 tables
0 supplements
84 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|---------------|
| 1. <i>Mate Bilić</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. <i>Stela Jokić</i> , PhD, assistant prof. | supervisor |
| 3. <i>Maja Molnar</i> , PhD, assistant prof. | co-supervisor |
| 4. <i>Lidija Jakobek</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: August 31, 2015.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Ovom prilikom zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Steli Jokić koja mi je svojim stručnim znanjem i mnogobrojnim savjetima omogućila realizaciju ovog/svog diplomskog rada. Također zahvaljujem što mi je upriličeno da upoznam osobe od kojih sam mogao dodatno učiti i usavršavati dotad stečeno znanje, i na ukazanom povjerenju, svim kavama, veselom društvu, te pomoći na koju sam uvijek mogao računati.

Zahvaljujem se komentorici doc. dr. sc. Maji Molnar, kolegi dr. sc. Kruni Aladiću i tehničkoj suradnici Danieli Paulik na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Hvala i mojim prijateljima, ponajviše Nevenu i Marini na najboljem mogućem društvu, podršci te svim sladoledima i kavama uz koje su studijski trenuci bili znatno zanimljiviji i olakšani.

Hvala majci, sestrama i bratu na ljubavi te podršci. Naposljetku, najtoplije zahvaljujem ocu i Marijani što su bili uz mene u mojim lijepim i teškim trenucima i bez čije bezuvjetne ljubavi i podrške moje studiranje ne bi bilo moguće.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. GROŽĐE	6
2.1.1. Komina.....	6
2.1.2. Groždano ulje	7
2.2. EKSTRAKCIJA.....	8
2.2.1. EKSTRAKCIJA SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA	8
2.2.2. SUPERKRITIČNI UGLJIČNI DIOKSID	11
2.3. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA	14
CENTRALNO KOMPOZITNI PLAN POKUSA	17
2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST.....	18
2.4.1. Komina kao izvor prirodnih antioksidanasa.....	19
2.4.2. DPPH metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti	20
2.4.3. Tokoferoli.....	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. ZADATAK	24
3.2. MATERIJALI.....	24
3.2.1. Sjemenke grožđa	24
3.2.2. Reagensi.....	25
3.2.3. Uređaji	25
3.3. METODE	26
3.3.1. Određivanje udjela vlage i ulja u sjemenkama grožđa	26
3.3.2. Priprema uzoraka za ekstrakciju superkritičnim CO ₂	27
3.3.3. Ekstrakcija ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO ₂	28
3.3.4. Optimiranje procesa ekstrakcije superkritičnim CO ₂ primjenom metode odzivnih površina	30
3.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti	31
3.3.6. Određivanje tokoferola	32
4. REZULTATI.....	33
5. RASPRAVA.....	39
6. ZAKLJUČCI	45
7. LITERATURA	49

Popis oznaka, kratica i simbola

ANOVA	Analiza varijance (<i>engl.</i> Analysis of variance)
c	Količinska ili množinska koncentracija (kmol m^{-3})
CCD	Centralno kompozitni plan pokusa (<i>engl.</i> Central composite design)
CCRD	Centralno kompozitni rotacijski plan pokusa (<i>engl.</i> Central composite rotation design)
CO_2	Ugljični dioksid
D	Koeficijent difuzije ili difuzivnost (m^2s^{-1})
DPPH	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil
GRAS	Generalno prihvaćen kao sigurno (<i>engl.</i> Generally recognized as safe)
m_{0-5}	Odvagana masa uzorka (g)
N	Brzina prijelaza mase (kgs^{-1} ili kmols^{-1})
p_c	Kritični tlak (MPa)
RSM	Metoda odzivne površine (<i>engl.</i> Response Surface Methodology)
SFE	Ekstrakcija superkritičnim fluidima (<i>engl.</i> Supercritical fluid extraction)
T_c	Kritična temperatura (K)
X	Udaljenost (m)
ρ_c	Gustoća fluida u kritičnoj točki (kg m^{-3})
Y	Odzivna funkcija zadana modelom
θ_0	Konstanta jednadžbe odzivnog polinoma
θ_i	Koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
θ_{ii}	Koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma
θ_{ij}	Koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma
$x_{i,j}$	Ispitivane nezavisne varijable

1. UVOD

Republika Hrvatska ima velike površine pod vinogradima s proizvodnjom vina raznih sorti grožđa. Za područje Slavonije i Baranje proizvodnja vina predstavlja važnu gospodarsku djelatnost. Tijekom proizvodnje vina nastaje znatna količina komine kao vrijedan nusproizvod, koja se danas uglavnom koristi kao gnojivo u vinogradima. Suhu kominu kao nusproizvod čini oko 38 % sjemenki, koje mogu sadržavati od 10 do 15 % ulja, što varira između bijelog i crvenog grožđa (Beveridge i sur., 2005). Ulje iz sjemenki grožđa je vrlo zanimljivo za prehrambenu industriju zbog sastava i mogućnosti da se koristi kao nutritivno vrijedno jestivo ulje. Karakterizirano je visokim stupnjem nezasićenih masnih kiselina (90 % poli- i mononezasićenih masnih kiselina) (Baydar i Akkurt., 2001; Bail i sur., 2008; Passos i sur., 2010) te nerafinirano ulje sadrži nekoliko bioaktivnih spojeva, kao što su tokoferoli i fenolni spojevi, čemu mogu doprinijeti antioksidacijskim djelovanjem (Bail i sur., 2008; Passos i sur., 2010). Fernandes i sur. (2013) navode kako ulje sjemenki grožđa predstavlja odličan izvor vitamina E uz to što ima visok antioksidativni potencijal, dok Bail i sur. (2008) ističu kako je tretirano i rafinirano groždano ulje iz proizvodnje bijelih vina imalo niži sadržaj ukupnih fenola, nego ulje iz proizvodnje crvenih vina. Isti je zaključak bio za antioksidacijsko djelovanje, pokazujući kako ovi spojevi imaju važnu ulogu u antioksidacijskoj aktivnosti tih ulja. Kako su ti bioaktivni spojevi, naročito tokoferoli vrlo osjetljivi na uvjete procesiranja, blagi temperaturni uvjeti ekstrakcije, kao oni što se koriste u superkritičnoj fluidnoj ekstrakciji (SFE) trebali bi ići u njihovu korist.

Prinos ulja ovisi o tehnici ekstrakcije, vrsti otapala kao i uvjetima rada. SFE je privukla veliku pozornost kao obećavajuća alternativa tradicionalnoj ekstrakciji otapalima i mehaničkom prešanju u preradi hrane. Ovaj snažan proces separacije privukao je veći interes za komercijalnu primjenu, posebice zbog ekoloških prednosti u odnosu na sadašnje tradicionalne metode ekstrakcije organskim otapalima i boljim prinosima ekstrakcije u usporedbi s mehaničkim prešanjem (Jokić i sur., 2014a). Veliki broj faktora utječe na proces SFE, tako da je vrlo važno odrediti najvažnije faktore na promatrane odzive. Primjerice, kako bi pronašli najvažniji faktor u nekom eksperimentu, koriste se planovi pokusa poput Centralno kompozitnog ili Box Behnken plana pokusa. Ovi planovi pokusa omogućuju pronalazak optimalne razine faktora u SFE (Sharif i sur., 2014). Metoda odzivnih površina (RSM) pokazala se kao vrlo korisnom u modeliranju i analizi problema u kojima na promatrani odziv utječe nekoliko varijabli (Madamba, 2002). Plan pokusa i odgovarajuća

statistička analiza s malim brojem pokusa u podešavanju parametara SFE postala je vrlo popularna u ovom području.

Cilj provedenog istraživanja je u korištenju otpada iz proizvodnje vina s posebnim naglaskom na sjemenke grožđa i novu zelenu tehnologiju, tj. SFE. Superkritični CO₂ kao novo zeleno otapalo razmatra se intenzivno posljednjih godina te se pokazao kao vrlo poželjno otapalo u separacijskim procesima budući da je neotrovan, nezapaljiv, bez okusa i mirisa, jeftin i lako dostupan u većim količinama, kao i zbog toga što je ekološki prihvatljivo i GRAS otapalo. Duba i Fiori (2015) su istraživali učinak glavnih procesnih varijabli koje utječu na superkritičnu CO₂ ekstrakciju ulja iz sjemenki grožđa, ali u ovom istraživanju primjenom metode odzivnih površina moguće je dobiti preciznije rezultate, iz razloga što je interakcija ispitivanih parametara ekstrakcije također uključena.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. GROŽĐE

Grožđe je plod vinove loze (lat. *Vitis vinifera* L.) te je jedna od najrasprostranjenijih voćarskih kultura u svijetu. Zbog blagotvornih učinaka na ljudsko zdravlje i gospodarskog značaja, grožđe je plod koji se široko uzgaja i konzumira. Može se konzumirati sirovo ili se koristi za proizvodnju vina, pekmeza, sokova, ulja itd (El-kassas i sur., 2014; Sousa i sur., 2014). Izvanredan je izvor fitonutrijenata, posebice fenola i polifenola. Prema posljednjim istraživanjima pomaže u regulaciji šećera u krvi, kardiovaskularnim bolestima, bolestima dišnog, živčanog i imunološkog sustava te ima protuupalne učinke (Mateljan, 2007).

Pod utjecajem klimatskih uvjeta i primjena agrotehničkih mjera struktura grozda se mijenja, što utječe na vegetacijski ciklus, a time na bujnost trsa, prirodu i kakvoću grožđa. Grozd se sastoji od peteljkovine i bobice, a bobica od sjemenke, mesa i kože. Peteljkovinu čine peteljka i peteljčice, te njen udio varira od 2 do 5 %. Kožica sadrži kiseline, polifenole i ostale tvari boje, aromatične tvari, minerale i dr., te je kožica crnih sorti znatno bogatija polifenolima i bojom, nego kožica bijelih sorti. U bobici grozda se nalazi od dvije do sedam sjemenki, ali su neke sorte i bez njih. Voda (25 – 50 %) i ugljikohidrati (30 – 35 %) najviše doprinose kemijskom sastavu sjemenki, dok se sadržaj ulja kreće od 12 do 20 %. Meso bobice čini 75 – 85 % težine bobice (Zoričić, 1996).

2.1.1. Komina

Preradom grožđa pri proizvodnji vina zaostaje od 13,5 do 14,5 % komine, a taj se udio može povisiti i do 20 % ovisno o sortimentu i jačini prešanja. Ekonomski gledano, komina se još ne iskorištava na najbolji mogući način. Međutim, njena upotreba u prehrambenoj industriji može doprinijeti smanjenju troškova proizvodnje kao i za razvoj novih proizvoda (Baydar i Akkurt., 2001). Oko 20 – 26 % komine čine sjemenke koje su bogate proteinima te sadrže od 8 do 15 % ulja s visokim sadržajem vitamina E (Baydar i Akkurt., 2001; Passos i sur., 2008). Grožđanu kominu također karakterizira veliki sadržaj fenolnih spojeva zbog loše ekstrakcije tokom proizvodnje vina (Arvanitoyannis i sur., 2006). Oprezno, ali brzo sušenje komine nakon proizvodnje vina nužno je kako bi se postigla visoka kvaliteta grožđanog ulja sa svojim karakterističnim mirisom i okusom, kao i sadržajem polifenolnih spojeva (Bail i sur., 2008).

2.1.2. Groždano ulje

Sjemenke grožđa imaju prepoznatljivu kvalitetu zbog visokih razina nezasićenih masnih kiselina, ponajviše linolne i oleinske, kao i antioksidanasa. Njihov sadržaj ulja varira ovisno od sorte grožđa, stupnja zrelosti, tla, klime i drugih faktora (Crews i sur., 2006). Prema Mattick i Rice (1976) sjemenke grožđa su izrazito bogate linolnom kiselinom (preko 71,5 %). Popa (2009) je također potvrdio visoki sadržaj linolne kiseline koji se kreće oko 72 %, uz visoki sadržaj nezasićenih masnih kiselina (88 %).

Groždano ulje se u prosjeku sastoji od 90 % poli- i mononezasićenih masnih kiselina, koje su odgovorne za njegovu nutritivnu vrijednost, posebice linolne kiseline (58 – 78 %), zatim oleinske kiseline (3 – 15 %) uz nizak sadržaj zasićenih masnih kiselina oko 10 % (Bail i sur., 2008). U **Tablici 1** prikazan je sastav masnih kiselina groždanog ulja. Udio linolne kiseline viši je u odnosu na bilo koje drugo ulje, poput suncokretovog ili kukuruznog ulja, što groždano ulje čini pogodnim za skladištenje zbog njegove visoke stabilnosti (Molero Gomez i sur., 1996). Nerafinirano ulje sadrži bioaktivne spojeve, poput tokoferola (5 – 52 mg/100 g) i fenolnih spojeva, čemu mogu doprinijeti svojim antioksidacijskim djelovanjem (Bail i sur., 2008; Passos i sur., 2010). Nadalje, neuobičajeno visoka točka dimljenja (oko 190 – 230 °C) čini groždano ulje izrazito pogodnim za kulinarske svrhe (Bail i sur., 2008).

Tablica 1 Sastav masnih kiselina groždanog ulja prema nekim autorima (% m/m)

MASNA KISELINA	Baydar i sur., 2001	Ohnishi i sur., 1990	Barron i sur., 1988	Mattick i Rice, 1976	Sabir i sur., 2012
Palmitinska (16:0)	6,5 – 9,7	6,7 – 8,9	9,56; 9,22	5,78 – 7,64	6,9 – 12,9
Stearinska (18:0)	3,5 – 7,3	1,1 – 5,3	4,37; 4,33	2,50 – 3,49	1,44 – 4,69
Oleinska (18:1)	17,8 – 26,5	9,7 – 17,5	22,87; 19,75	13,69 – 21,47	16,2 – 31,2
Linolna (18:2)	60,1 – 70,1	69,2 – 80,5	62,85; 66,40	66	53,6-69,6

U pogledu svoje primjene, sve je popularnije u kulinarstvu, medicinskim svrhama te farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Passos i sur., 2008).

2.2. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je jedan od temeljnih separacijskih procesa u pojedinim granama prehrambene industrije, kao što su proizvodnja ulja i šećera, ili se koristi za dobivanje različitih aromatičnih sastojaka iz biljnih sirovina. Ekstrakcija se definira kao proces izdvajanja neke tvari iz krute ili tekuće smjese prikladnim otapalom u kojem je ta tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka smjese. Princip ekstrakcije je sadržan u pojavi molekulske difuzije, koju karakterizira izjednačavanje otopljenih tvari u sustavima koji dođu u međusobni dodir, a matematički se opisuje prvim zakonom Adolfa Ficka:

$$N = -D \frac{dc}{dx} \quad (1)$$

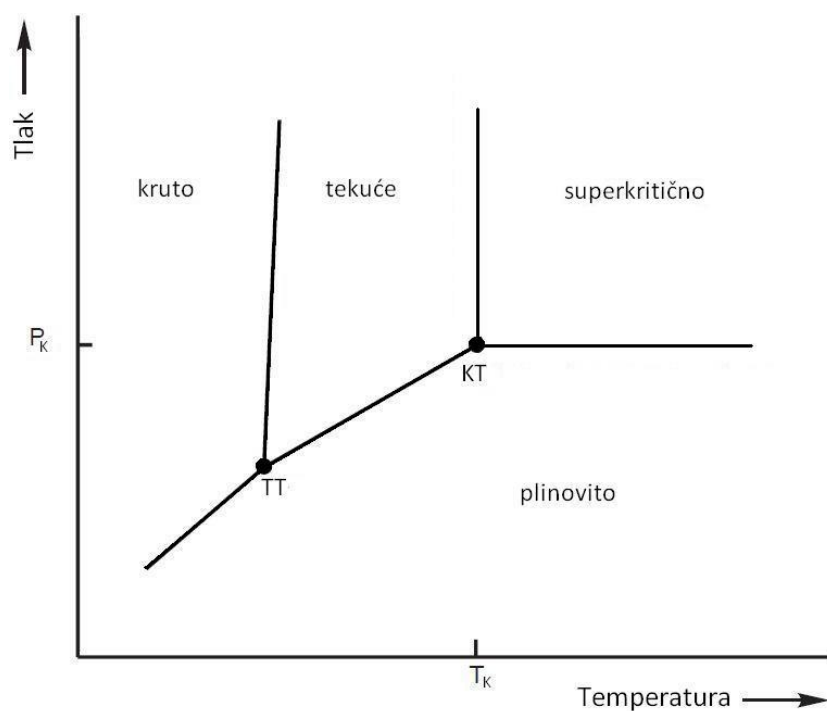
gdje je N (kgs^{-1} ili kmols^{-1}) brzina prijelaza mase, c (kmolm^{-3}) količinska ili množinska koncentracija, x (m) udaljenost, a D (m^2s^{-1}) koeficijent difuzije ili difuzivnost (Lovrić, 2003).

Procesi ekstrakcije mogu se provesti diskontinuirano (šaržno), pseudokontinuirano i kontinuirano. Diskontinuirani postupci koriste jedan uređaj za ekstrakciju, dok se međusobnim povezivanjem takvih uređaja u bateriju postiže proces koji ima značajke kontinuiranog procesa, a naziva se pseudokontinuirani proces. Danas se proces ekstrakcije najčešće provodi u kontinuiranim uređajima različitih izvedbi, prilagođenim zahtjevima u pogledu sirovine, kapacitetu i drugim uvjetima (Lovrić, 2003).

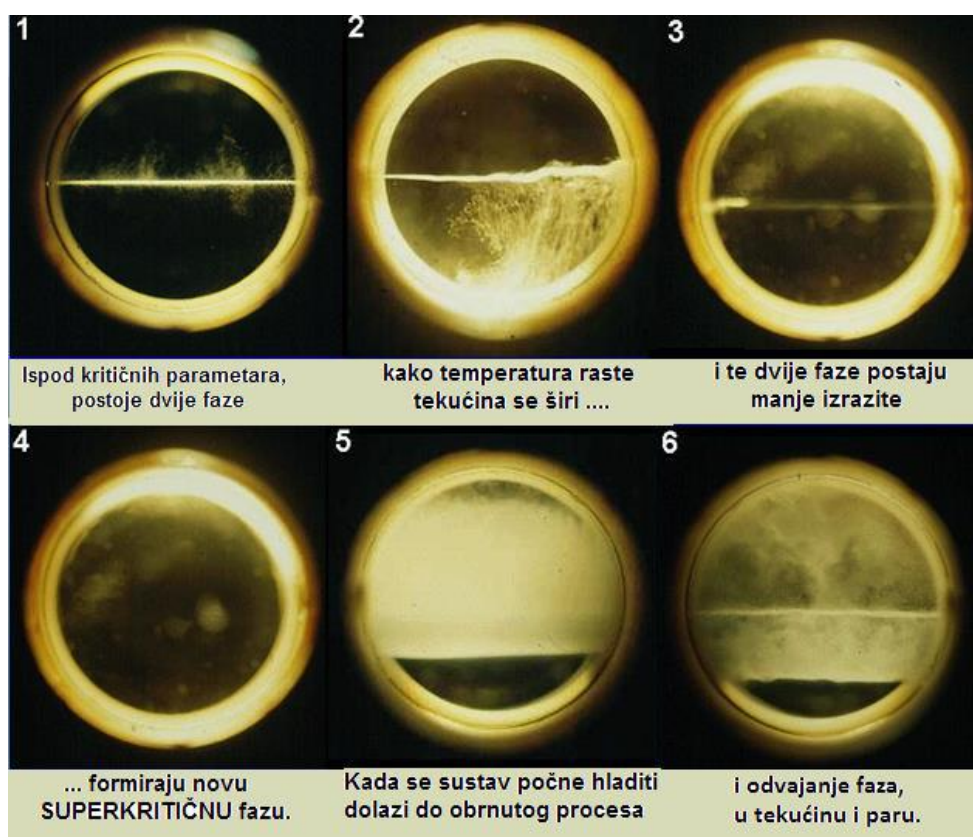
2.2.1. Ekstrakcija superkritičnim fluidima

Ekstrakcija superkritičnim fluidima ili SFE je operacija prijenosa tvari bazirana na činjenici da pojedini plinovi postaju izuzetno dobra otapala za određene vrste kemijskih spojeva u blizini svoje kritične točke, ili u superkritičnom području (Aladić, 2015).

U ovom procesu otapalo je plin u uvjetima temperature i tlaka pri kojima ne dolazi do kondenzacije odabranog plina u kapljevinu. Pojedini plinovi posjeduju pojačanu sposobnost otapanja kada su komprimirani iznad kritične točke (temperature i tlaka) (**Slika 1**):



Slika 1 Fazni dijagram (tlak – temperatura) (Aladić, 2015)



Slika 2 Mehanizam superkritičnih fluida (Rot, 2015)

Karakteristika superkritičnog stanja je što postoji samo jedna faza u kojem fluid nije niti plin, niti tekućina (**Slika 2**). U tim uvjetima plin ima gustoću približno kao kapljevina, iako nije u kapljevitom stanju, neovisno o tlaku. Topljivost topljivih tvari je vrlo velika, skoro kao u kapljevini, viskoznost se približava viskoznosti normalnih plinova, a difuzija je dva reda veličine veća nego kod tipičnih tekućina (**Tablica 2**) (Brunner, 2005; Lovrić, 2003).

Tablica 2 Fizikalno-kemijska svojstva za plinovito, tekuće i superkritično stanje fluida

STANJE FLUIDA	Plin	Tekućina	Superkritični fluid
Gustoća (kgm^{-3})	1	300 – 900	1000
Koeficijent difuzije (cm^2s^{-1})	10^{-1}	$10^{-3} - 10^{-4}$	10^{-5}
Viskoznost ($\text{Pa}\cdot\text{s}$)	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}

Prednosti SFE u odnosu na ekstrakciju organskim otapalima:

- Superkritični fluidi kao i organska otapala imaju sposobnost otapanja, ali uz bolju difuziju, nižu viskoznost i manju površinsku napetost što je vidljivo iz prethodne **Tablice 2**,
- Separacija ekstrakta od otapala je brza i laka zbog mogućnosti regulacije topljivosti komponenata promjenom tlaka ili temperature,
- Otapala korištena u superkritičnoj ekstrakciji su jeftina i sigurna za okoliš. Također, u industrijskim procesima moguće je i recikliranje otapala,
- Bolja ekstrakcija termolabilnih komponenti uz njihovu minimalnu deformaciju,
- Može se primijeniti na sustave različitih kapaciteta od analitičkih, preparativnih, poluindustrijskih do velikih industrijskih postrojenja (Jokić, 2011).

SFE se odvija u pet uzastopnih faza:

- Difuzija superkritičnog fluida do površine čestice kroz film fluida koji je okružuje,
- Prodiranje i difuzija superkritičnog fluida kroz vanjski sloj sfernog omotača, krutog, inertnog materijala,
- Kontakt superkritičnog fluida s otopljenom tvari na površini neizreagirane jezgre i ekstrakcija otopljene tvari,
- Difuzija otopljene tvari (ulja) u superkritičnom fluidu kroz sloj vanjskog sfernog omotača krutog inertnog materijala na vanjsku površinu čestice,
- Difuzija otopljene tvari (ulja) u superkritičnom fluidu kroz film superkritičnog fluida koji okružuje česticu u glavnu struju fluida (Jokić, 2011).

Najvažniji čimbenici koji utječu na sam tijek SFE su:

- Tlak, temperatura, vrijeme ekstrakcije i protok otapala,
- Gustoća, viskozitet te difuzivnost otapala i supstance koja se ekstrahira,
- Interakcije između molekula otapala, topljive supstance i netopljivog dijela krutog materijala u kome se nalazi topljiva supstanca, koje utječu na faznu ravnotežu i koeficijente difuzije,
- Dodatak različitih kootapala,
- Oblik, veličina i raspodjela veličina čestica materijala u sloju, poroznost čestica i poroznost sloja (Jokić, 2011).

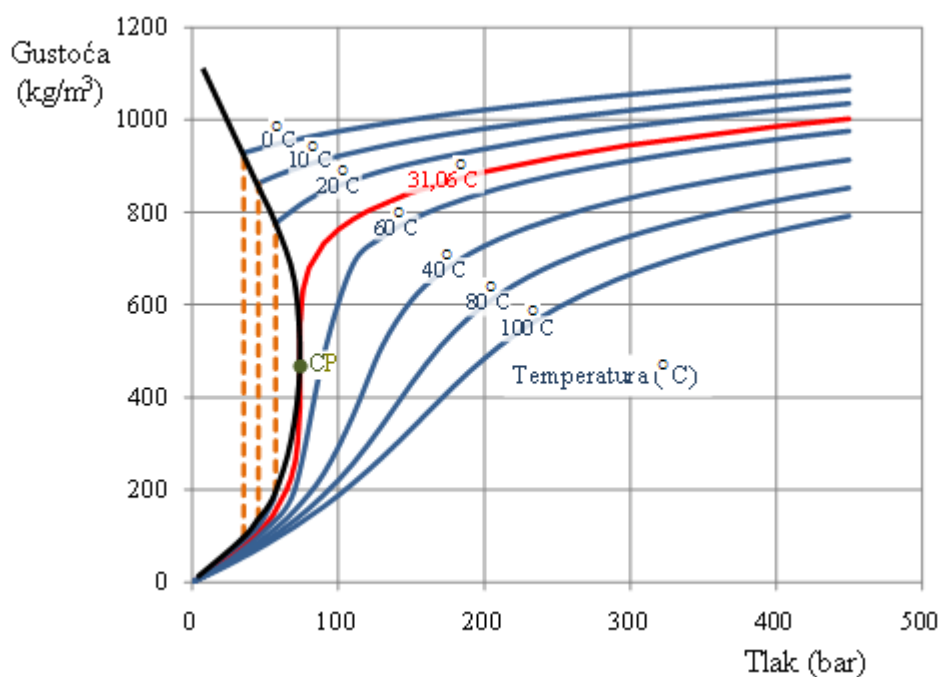
2.2.2. Superkritični ugljični dioksid

Ugljični dioksid (CO_2) predstavlja najzanimljiviji fluid za ekstrakciju prirodnih tvari i u tehnologiji pojedinih prehrambenih proizvoda. Relativno je jeftin, lako dostupan, netoksičan, neškodljiv za okolinu, GRAS otapalo i dobrih svojstava otapanja većine sastojaka koji se koriste u proizvodnji hrane, uz nisku kritičnu temperaturu ($31,3\text{ }^\circ\text{C}$ pri kritičnom tlaku $72,9$ bara). Štoviše, u preko 90 % slučajeva SFE koristi se superkritični CO_2 kao otapalo upravo zbog svojih prednosti, a osim njega korišteni su etan, propan, butan i neki halogeni ugljikovodici (**Tablica 3**) (Aladić, 2015; Capuzzo i sur., 2013; Temelli, 2009; Lovrić, 2003; Demirbas, 2001).

Tablica 3 Fizikalno-kemijska svojstva pojedinih superkritičnih fluida

OTAPALO	T_c (K)	P_c (MPa)	ρ_c (gcm ⁻³)
Metan	191	4,06	0,162
Etilen	282	5,03	0,218
Ugljični dioksid	304	7,38	0,468
Dietil-eter	467	3,64	0,265
Heksan	507	3,05	0,23
Aceton	508	4,7	0,287
Metanol	513	8,09	0,272
Amonijak	405	11,3	0,225
Voda	647	22	0,322

Moć otapanja komprimiranog CO₂ može se opisati preko gustoće tekućine. Gustoća CO₂ se kreće od 0,15 do 1,0 gcm⁻³ i ovisi o tlaku i temperaturi (**Slika 3**). Svojstva CO₂ i superkritičnog CO₂ prikazana su pomoću prikaza ovisnosti gustoće CO₂ o promjeni tlaka pri konstantnoj temperaturi. U superkritičnoj stanju, iznad kritične vrijednosti temperature i tlaka, gustoća se može podešavati promjenom tlaka ili temperature (Aladić, 2015).

**Slika 3** Ovisnost gustoće CO₂ o tlaku i temperaturi (Jokić, 2011)

Promjenom tlaka i temperature, omogućeno je da se iz biljnog materijala dobiju eterična i biljna ulja, začini i druge komponente, kao i komponente s antioksidacijskim, antibakterijskim i farmakološki aktivnim djelovanjem (Aladić, 2015).

Snaga otapanja superkritičnog CO₂ može se sažeti u nekoliko pravila (Jokić, 2011; Brunner, 2005):

- Otapa nepolarne ili blago polarne spojeve,
- Velika snaga otapanja za spojeve male molekularne mase, koja se smanjuje povećanjem molekularne mase,
- Kisikovi organski spojevi s niskom ili srednjom molekularnom masom su vrlo topljivi,
- Proteini, polisaharidi, šećeri i mineralne soli, voćne kiseline i glikozidi su netopljivi,
- Superkritični CO₂ ima sposobnost odvajanja spojeva koji su manje isparljivi, imaju veću molekularnu masu i/ili su više polarni, s porastom tlaka,
- Pigmenti su slabo topljivi,
- Voda ima slabu topljivost (<0,5 % m/m) na temperaturama ispod 100 °C.

Superkritični CO₂ ima polarnost usporedivu s tekućim pentanom i stoga je kompatibilan za otapanje lipofilnih nepolarnih spojeva, kao što su lipidi i eterična ulja. Međutim, ovaj niski polaritet čini superkritični CO₂ manje pogodnim za ekstrakciju polarnih komponenti. Praktični pristup rješenju ovoga problema je uporaba kootapala. Dodatkom manjih količina etanola, modifikatora i drugih otapala može se povećati topivost polarnih spojeva i selektivnost procesa (Capuzzo i sur., 2013; Abbas i sur., 2008).

Unatoč relativno visokim investicijskim ulaganjima, u mnogim je slučajevima trošak proizvodnje konkurentan tradicionalnim metodama. Također, operativni su troškovi znatno niži zahvaljujući jednostavnoj regeneraciji otapala (Rot, 2015; Ahmed i Rahman, 2012).

2.3. OPTIMIRANJE PROCESNIH PARAMETARA METODOM ODZIVNIH POVRŠINA

Optimizacija se često primjenjuje u analitičkoj kemiji te se definira kao sredstvo za otkrivanje i poboljšanje uvjeta, te parametara nekog procesa u svrhu postizanja maksimalnog prinosa (odziva). Tradicionalno se ovaj postupak provodio radi praćenja utjecaja jednog parametra u vremenu na eksperimentalni odziv, gdje bi jedan faktor bio podložan promjeni, a drugi konstantan (Bezzerra i sur., 2008).

Problem ovakvoga pristupa je što praćenjem i mijenjanjem samo jednog parametra uz ostale konstantne parametre nije moguće dobiti stvarnu sliku utjecaja procesnih parametara na promatrani proces. Tome u prilog ide što većina tehnoloških procesa ovisi o brojnim procesnim parametrima, a takvim pristupom optimizaciji zahtjevao bi se veliki utrošak vremena te veliki broj eksperimenata, bez uzimanja u obzir interakcija promatranih parametara procesa. Današnji pristup optimizaciji procesa podrazumijeva korištenje multivarijantnih statističkih tehnika, koje uzimaju u razmatranje i interakciju ispitivanih parametara procesa (Liyana-Pathirana i Shahidi, 2005).

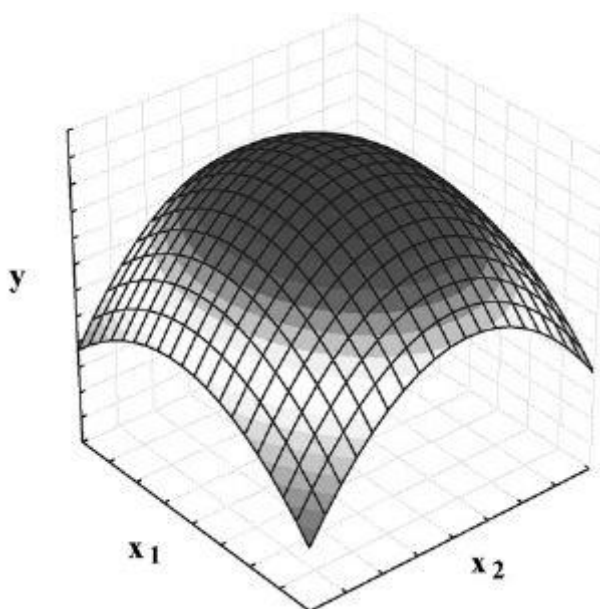
Kao važan alat u statističkom planiranju eksperimenta, metoda odzivnih površina (RSM) je skup matematičkih i statističkih tehnika korisnih za modeliranje i analizu utjecaja nezavisnih varijabli (procesnih parametara) na promatrani odziv regresijskom analizom s ciljem poboljšanja, razvoja i optimiranja procesa (Bradley, 2007). Myers i Montgomery (1995) navode kako se RSM često upotrebljava za optimizaciju i planiranje eksperimenta kemijskih reakcija u industrijskim procesima. Također, sve je veći broj znanstvenih istraživanja koja koriste RSM za optimizaciju procesa u inženjerstvu, biokemiji, poljoprivredi i biološkim znanostima, kemijskim znanostima, kemijskom inženjerstvu, ekološkom inženjerstvu i drugdje.

Osnovni koraci u primjeni RSM kao tehnike optimizacije procesnih uvjeta su sljedeći:

- odabir nezavisnih varijabli koje značajno utječu na promatrani proces s definiranim rasponom ispitivanih parametara,
- odabir dizajna eksperimenta te provođenje eksperimenta prema ponuđenoj shemi kombinacije parametara,

- aproksimacija eksperimentalnih podataka matematičkim modelom primjenom matematičko-statističkih metoda,
- evaluacija prikladnosti modela,
- određivanje optimalnih vrijednosti ispitivanih varijabli (Bezzeri i sur., 2008).

Cilj metode je dobiti odnos nezavisnih varijabli na zavisnu varijablu (odziv) preko odzivne funkcije, te zaključiti na koji način ulazni parametri modela utječu na promatrani odziv. Potrebno je odabrati odgovarajući dizajn eksperimenta (plan pokusa) kojim će se definirati eksperimenti koje je potrebno provesti, a provedbom pokusa u svim kombinacijama određenim dizajnom eksperimenta (matrica plana pokusa) dobiva se kontinuirana ploha koja spaja visine izmjerenih vrijednosti (odzivna ploha). Funkcija koja opisuje odzivnu plohu naziva se odzivna funkcija, a predstavlja ovisnost zavisne varijable o ispitivanim nezavisnim varijablama kao i međusobnim interakcijama. Pridruživanjem odgovarajućeg polinoma svakoj funkciji moguće je proračunati koeficijente jednadžbe. RSM se može predstaviti grafički, gdje trodimenzionalni graf pomaže jednostavnijem razumijevanju i pregledu oblika odzivne plohe (**Slika 4**), iako je ponekad jednostavnije razumjeti odzivnu plohu preko dvodimenzionalnog grafa.



Slika 4 Primjer trodimenzionalnog prikaza odzivne plohe

Ovisno o željenoj odzivnoj funkciji odabiremo dizajn eksperimenta. Kada eksperimentalni podaci ne tvore krivulje te se aproksimiraju linearnom funkcijom koristi se plan pokusa za

modele prvog reda. Kod ovakvih modela na odzivnu funkciju utječu samo nezavisne varijable, bez njihove međusobne interakcije. Dobivena aproksimacijska funkcija za takve modele prvoga reda je (2):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \dots + \beta_k \cdot x_k + \varepsilon \quad (2)$$

Kada nije moguće eksperimentalne podatke opisati linearnom funkcijom koristi se dizajn eksperimenta za kvadratni odziv površine i tada je aproksimacijska funkcija za modele drugog reda (kvadratni polinom), (3) kao što su trofaktorijalni plan pokusa na tri razine, centralno kompozitni plan pokusa, Box-Behnken-ov plan pokusa. Primjenom ovakvih modela dobije se funkcionalna zavisnost o ispitivanim nezavisnim varijablama te njihovim interakcijama, kao i informacija o minimumu ili maksimumu funkcije.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot x_i^2 + \sum_{i < j} \sum_{i=2}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

gdje su:

Y – odzivna funkcija zadana modelom,

β_0 – konstanta jednadžbe odzivnog polinoma,

β_i – koeficijent linearnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ii} – koeficijent kvadratnog člana jednadžbe odzivnog polinoma,

β_{ij} – koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma,

$x_{i,j}$ – ispitivane nezavisne varijable (Aladić, 2015; Bezzera i sur., 2008; Bradley, 2007; Myers i Montgomery, 2003).

Nakon određivanja koeficijenata odzivne funkcije primjenom metode najmanjih kvadrata mogu se primjenom analize varijance (ANOVA) ili studentovog t-testa izdvojiti oni faktori ili njihove interakcije koji značajno utječu na promatrani proces (Bradley, 2007).

Planovi pokusa međusobno se razlikuju obzirom na broj potrebnih pokusa, odabir eksperimentalnih točaka te razinu ispitivanih varijabli, a najčešće korišteni oblici planova pokusa su:

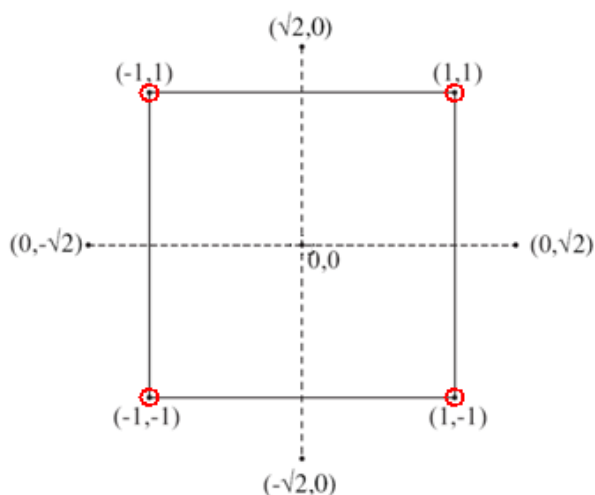
- Centralno kompozitni plan pokusa (CCD),
- Plošno-centrirani kompozitni plan,
- Faktorijalni plan pokusa,
- Doehlert pokus i dr (Bezzerra i sur., 2008).

Centralno kompozitni plan pokusa

Centralno kompozitni planovi pokusa (CCD) spadaju u klasu najčešćih planova pokusa u metodologiji odzivne površine (Cajner, 2011).

Dodavanjem centralnog stanja pokusa te stanja pokusa jednako udaljenih od centralne točke na postojeći faktorski plan pokusa na dvije razina formira se CCD. Kod CCD broj izvođenja smanjen je u usporedbi s potpunim faktorskim modelom pokusa, pogotovo u slučaju više od tri faktora. Rezultat je plan pokusa koji je optimalan, u pogledu minimalne varijance, za modele jednostavnog prvog reda i modele prvog reda s interakcijama dvaju faktora (Cajner, 2011).

Kod CCD svaki faktor mijenja se na pet razina. Svrha plana pokusa je pronalaženje matematičkog modela koji opisuje proces uz minimalan broj potrebnih pokusa. Na **Slici 5** prikazana je shema eksperimentalnih točaka ovog pokusa. Koordinatna točka (0, 0) označava centralnu točku gdje razina svakog faktora ima srednju vrijednost, a koja se ponavlja pet puta. Ovim ponavljanjem se postiže smanjenje varijance i dobra procjena čiste greške. Koordinatne točke (0, $\sqrt{2}$; $\sqrt{2}$, 0; $-\sqrt{2}$, 0; 0, $-\sqrt{2}$) označavaju četiri aksijalne točke udaljene $\alpha=1,41$ od središta, a crveni krugovi označavaju četiri vršne točke plana pokusa (Živković i sur., 2012).

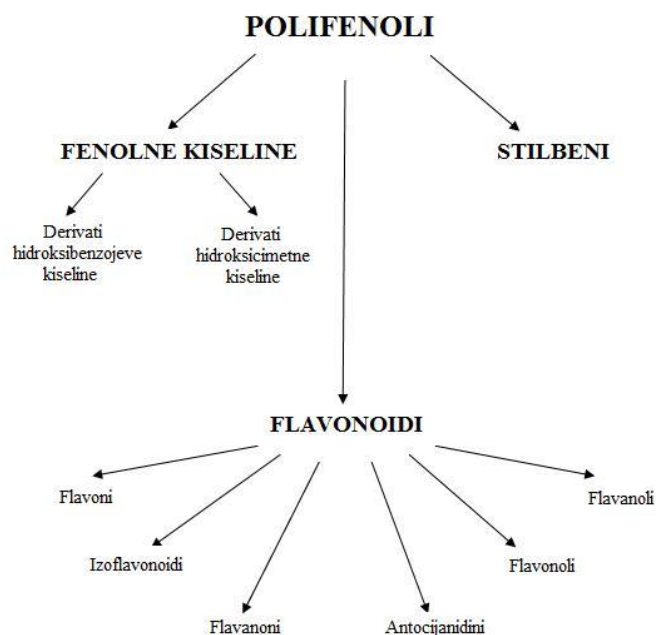


Slika 5 Shematski prikaz eksperimentalnih točaka CCD

2.4. ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST

Slobodni radikali su atomi, ioni ili molekule, koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi. Nespareni elektroni su uzrok njihove visoke i neselektivne reaktivnosti. Većina slobodnih radikala su kraktoživući i lako podliježu reakcijama razgradnje (Halliwell i Gutteridge, 1989). Slobodni radikali mogu nastati: termolizom, elektromagnetskom radijacijom, redoks reakcijama, enzimskim i kemijskim procesima (Acworth, 2003). Masti, ulja i hrana koja sadrži lipide se zagrijavanjem ili dugotrajnim skladištenjem kvare jer podliježu degradacijskim procesima, među kojima je glavni oksidacija lipida i razgradnja oksidacijskih produkata. Nužno je usporiti ove procese kako bi se očuvala nutritivna vrijednost, senzorska kvaliteta i zdravstvena sigurnost hrane (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

U cilju zaštite namirnica od oksidacije koriste se specifični aditivi koji inhibiraju oksidaciju. Ovi inhibitori oksidacije, nazivaju se i antioksidansi te se međusobno razlikuju po kemijskoj strukturi i mehanizmu djelovanja. Među prvim antioksidansima koji su se koristili za konzerviranje hrane su bili začini, međutim oni su zamijenjeni sintetskim koji su se pokazali kao jeftiniji, utvrđenih čistoća i ujednačenijih antioksidacijskih svojstava. Ipak, prednost se daje prirodnim antioksidansima zbog toksikoloških razloga, zahtjeva potrošača i zbog činjenice da su topljiviji u uljima i vodi što olakšava njihovu primjenu u prehrambenim proizvodima. Najznačajniji antioksidansi su ekstrakti biljaka bogati polifenolima (**Slika 6**) (Moure i sur., 2001; Hagerman i sur., 1998).



Slika 6 Opća podjela polifenola

2.4.1. Komina grožđa kao izvor prirodnih antioksidanasa

Komina grožđa je bogat izvor fenolnih spojeva, jer je njihova ekstrakcija tokom procesa proizvodnje vina veoma slaba. Glavni predstavnici su antocijanini, katehini, flavanol glikozidi, fenolne kiseline, alkoholi i stilbeni (Schieber i sur., 2001).

Najzastupljenija grupa fenolnih spojeva u biljkama su flavonoidi. Ovisno o mjestu nalaska u grožđu (sjemenka, ljuska, endokarp), razlikuje se kemijska struktura i količina fenolnih spojeva (Jordão i sur., 2001; Souquet i sur., 1996; Escribano-Bailón i sur., 1992, 1995; Prieur i sur., 1994; Ricardo da Silva i sur., 1991, 1992; Bourziex i sur., 1986). U sjemenkama se nalazi oko 60 % polifenola grožđa. Fenolni spojevi sjemenke su:

- Flavan-3-oli: (+) – katehin, (-) – epikatehin i (-)-epikatehingalat,
- Proantocijanidini: dimeri i oligomeri sastavljeni od monomernih flavan-3-ola povezanih C4-C8 i/ili C6-C6 vezama,
- Galna kiselina.

Flavan-3-oli sjemenke grožđa su glavne komponente grožđa i čine od 50 do 70 % ukupnog sadržaja flavanola sjemenke, što zavisi od vrste grožđa. Osim slobodnog oblika, flavanoidi

(katehin, epikatehin, epikatehingalat) su monomerni konstituenti kondenziranih tanina (Fuleki i Ricardo da Silva, 1997).

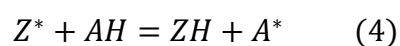
Fenolni spojevi se u biljnom materijalu nalaze u vakuolama iz kojih se oslobađaju ekstrakcijom otapalima, ekstrakcijom na čvrstoj fazi i SFE. Spomenuta SFE ima brojne, već ranije navedene prednosti nad tradicionalnim tehnikama ekstrakcije pa tako i ekstrakti SFE imaju veću antioksidacijsku aktivnost (Tipsrisukond i sur., 1998). Pri prvoj primjeni SFE korištenjem čistog CO₂ dobivalo se groždano ulje, a fenolne komponente se nisu ekstrahirale (Molero Gomez i sur., 1996). Primjenom metanola i etanola kao modifikatora CO₂ dobivaju se ekstrakti koji sadrže fenolne spojeve, a rezultati pokazuju da se veći prinos fenolnih spojeva dobiva primjenom metanola kao modifikatora (Murga i sur., 2000; Palma i sur., 1999).

2.4.2. DPPH metoda određivanja antioksidacijske aktivnosti

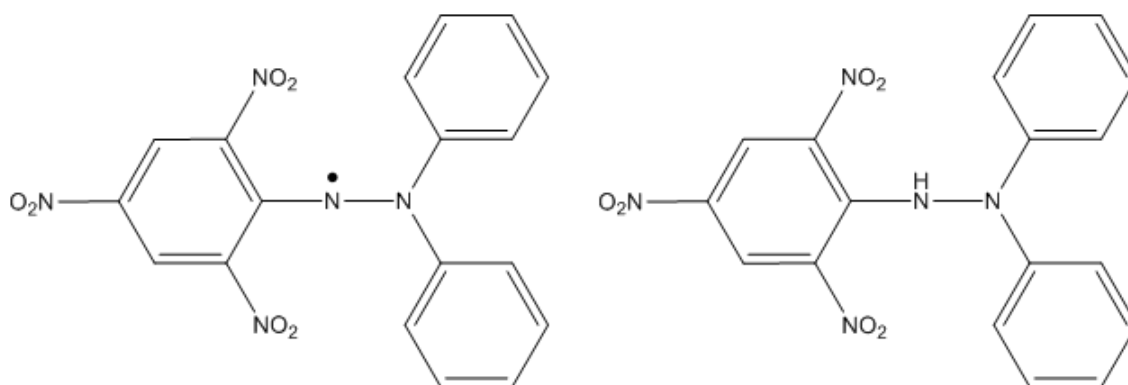
Danas postoji mnoštvo metoda za određivanje antioksidacijske aktivnosti, a kao jedna od metoda je i DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil) metoda. Tamno ljubičaste boje, DPPH radikal je jedan od rijetkih dušikovih radikala koji je stabilan zbog delokalizacije slobodnog elektrona kroz molekulu, tako da molekule ne dimeziriziraju, kao što je slučaj kod većine slobodnih radikala. Metoda mjerenja antioksidacijske aktivnosti pomoću DPPH se temelji na određivanju reducirajuće sposobnosti antioksidanasa prema DPPH radikalu, a sposobnost hvatanja slobodnih radikala se određuje mjerenjem pada apsorbancije pri 515 – 528 nm ili elektronskom paramagnetskom rezonancijom (De Magalhães, 2007).

DPPH metoda ovisi o otapalu, njegovom pH te strukturi antioksidansa, a može reagirati s fenolnim spojevima putem prijenosa vodikovog atoma ili elektrona što zavisi od polarnosti otapala. DPPH u polarnim otapalima (etanol i metanol) preferira prijenos elektrona, dok u nepolarnim otapalima preferira oduzimanje vodika (Yeo i sur., 2010; De Magalhães, 2007; Bondet i sur., 1997; Brand-Williams i sur., 1995).

Dodatkom antioksidansa otopini DPPH radikala dolazi do gubitka tamnoljubičaste boje, uslijed čega iz slobodnog radikala nastaje reducirani oblik (4), koji je svijetlo žuti difenilpikrilhidrazin (**Slika 7**) (Gacche i sur., 2006; Molyneux, 2004).



gdje je ZH reducirani oblik, a A^{*} je slobodni radikal nastao u prvom koraku. Nastali radikal tada ulazi u reakciju koja kontrolira broj reduciranih molekula DPPH s jednom molekulom reducensa. Gledano to na primjeru autooksidacije lipida ili drugih nezasićenih tvari, DPPH molekula Z^{*} predstavlja slobodne radikale, čiju aktivnost ihibira AH (antioksidans) (Molyneux, 2004).



Slika 7 Struktura difenilpikrilhidrazila (lijevo) i difenilpikrilhidrazina (desno) (Molyneux, 2004)

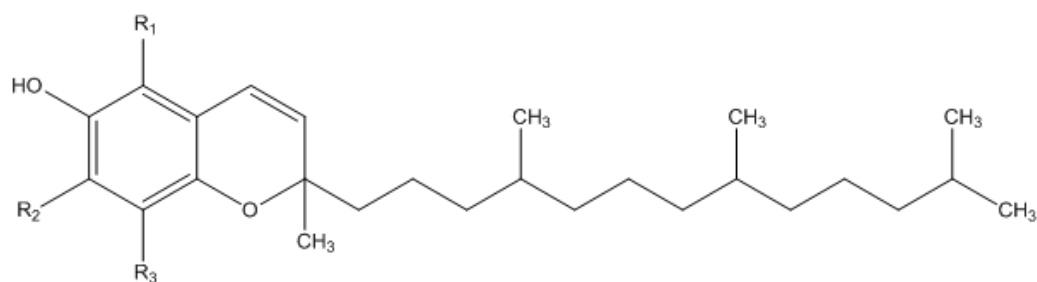
Prema Litwinienko i Ingold (2003) DPPH metoda je jednostavna i pogodna za određivanje antioksidacijske aktivnosti u namirnicama i biljnim proizvodima. Budući da se provodi na sobnoj temperaturi, eliminiran je rizik termalne degradacije molekula koje se ispituju (Bondet i sur., 1997), a radikal je stabilan i ne mora se posebno generirati prije upotrebe (Gachhe i sur., 2006).

2.4.3. Tokoferoli

Tokoferoli su jedni od najsnažnijih, topljivih u mastima prirodnih antioksidanasa koji sprječavaju oksidaciju nezasićenih masnih kiselina (Kamal-Edin i Appelqvist, 1996). Tokoferoli i tokotrienoli (tokoli), sažeti pod pojmom vitamina E, su skupina topljivih antioksidansa u masti s kromanolskim prstenom i hidrofobnim bočnim lancem (fitil u slučaju tokoferola, izoprenil kod tokotrienola) (Schwartz i sur., 2008). Postoje α -, β -, γ -, δ - tokoferoli i tokotrienoli, a razlikuju se ovisno o broju i položaju metilnih supstituenata u kromanolskom prstenu (**Slika 8**). Pri niskim koncentracijama tokoferoli pokazuju visoku antioksidacijsku

aktivnost, dok im u uljima djelotvornost opada pri porastu koncentracije (Brckan i Katić, 2013).

Groždano ulje je bogato α -tokoferolom, posjeduje visoku nutritivnu vrijednost što ga čini pogodnim za uporabu u kulinarske, farmaceutske i kozmetičke svrhe (Sabir i sur., 2012; Beveridge i sur., 2005).



<i>Naziv</i>	<i>R₁</i>	<i>R₂</i>	<i>R₃</i>
α -tokoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β -tokoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ -tokoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ -tokoferol	H	H	CH ₃

Slika 8 Struktura tokoferola (Gliszczyńska-Świgło i sur., 2007)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio ovoga rada realiziran je na Katedri za projektiranje tehnoloških procesa i kontstrukcijske materijale te na Katedri za kemiju i ekologiju na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu u Osijeku.

3.1. ZADATAK

Zadatak rada bio je:

- Odrediti udio ulja i vlage u sjemenkama grožđa u aparaturi po Soxhletu i standardnom metodom AOAC 925.40,
- Pripremiti materijal za ekstrakciju – usitnjavanje s ciljem povećanja površine uzorka; klasiranje prosijavanjem na standardnoj seriji sita i utvrđivanje raspodjele veličine čestica,
- Izvršiti ekstrakciju ulja iz sjemenki grožđa pomoću superkritičnog CO₂ na laboratorijskom uređaju za ekstrakciju superkritičnim fluidima,
- Odrediti antioksidacijsku aktivnost ulja iz sjemenki grožđa koristeći DPPH metodu,
- Optimirati proces ekstrakcije ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO₂ primjenom metode odzivnih površina i korištenjem programa *Design Expert*[®],
- Napraviti screening tokoferola u dobivenom ulju iz sjemenki grožđa metodom plinske kromatografije s masenim detektorom.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Sjemenke grožđa

U radu su korištene sjemenke grožđa prikazane na **Slici 9** (sorta Cabernet Franc, vinogorje Baranja), dobivene od Poljoprivrednog fakulteta Osijek (Hrvatska), iz berbe 2014, uzete nakon sedam dana maceracije u vinifikatorima. Postupkom ekstrakcije superkritičnim CO₂ dobiveno je groždano ulje.



Slika 9 Sjemenke grožđa

3.2.2. Reagensi

Korišteni su sljedeći reagensi:

- *n*-heksan (J.T. Baker, Milano, Italija),
- CO₂ čistoće 99,97 % proizvođača Messer Croatia Plin (Osijek, Hrvatska),
- Za određivanje tokoferola korišteni su sljedeći standardi: β -, γ - i δ -tokoferol proizvođača Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, USA), α -tokoferol proizvođača Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Njemačka),
- Kalij Hidroksid (Sigma-Aldrich, SAD),
- DPPH (Sigma-Aldrich, SAD),
- Etil acetat (Sigma-Aldrich, SAD).

3.2.3. Uređaji

Korišteni su sljedeći uređaji:

- Analitička vaga (Denver instruments, Njemačka),
- Tehnička vaga (Kern, Njemačka),
- Mlin (Janke & Kunkel, IKA labortechnik, Njemačka),
- Vibracijsko sito (Labortechnik GmbH, Ilmenau, Njemačka),

- SOXTHERM (Gerdhart, Njemačka),
- Centrifuga (Sigma 2-16, Njemačka),
- Uređaj za ekstrakciju superkritičnim CO₂ (Osijek, Hrvatska),
- GC – MS uređaj (Agilent Technologies model 7890A, SAD),
- UV visible spektrofotometar Helios γ, (Thermo Spectronic, Cambridge, UK).

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje udjela vlage i ulja u sjemenkama grožđa

Udio vlage u sjemenkama grožđa određen je prema standardnoj metodi AOAC 925.40 (2000.) u dva ponavljanja. U osušenu, izvaganu aluminijsku posudicu izvagano je 5 g sjemenki te se posudica s podignutim poklopcem stavila u zagrijan sušionik (103 °C). Nakon 2 h sušenja posudica s poklopcem se stavila u eksikator na hlađenje do sobne temperature. Kada se ohladila, uzorak se izvagao te ponovo stavio s podignutim poklopcem u sušionik 1 h. Nakon toga se ponovo provodilo hlađenje i vaganje uzorka. Sušenje se ponavljalo do konstantne mase, odnosno dok razlika između dva uzastopna mjerenja nije bila najviše 0,005 g. Udio vlage u sjemenkama izračunat je prema sljedećem izrazu (5):

$$Udio\ vlage = \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \cdot 100 \quad (5)$$

gdje je:

m_0 – masa prazne posudice (g),

m_1 – masa posudice sa uzorkom prije sušenja (g),

m_2 – masa posudice sa uzorkom nakon sušenja (g).

Udio ulja u sjemenkama grožđa izmjeren je metodom po Soxhlet-u u automatskom sustavu za ekstrakciju SOXTHERM s *n*-heksanom (Aladić i sur., 2014.). U prethodne osušene (103 ± 2 °C) i izvagane čaše s točnošću odvage 0,001 g za ekstrakciju stavljeni su ekstrakcijski tuljci s prethodno odvaganim uzorkom (5 ± 0,001 g). U čaše se preko tuljca ulije 120 mL *n*-heksana. Budući da je uređaj potpuno automatiziran, potrebno je samo izabrati otapalo i

temperaturni program. Vrijeme ekstrakcije iznosilo je 2 h i 45 min. Nakon ekstrakcije čaše su osušene na 103 ± 2 °C kroz 1 h i potom izvagane. Sve analize su provedene u dva ponavljanja. Udio ulja izračunat je prema jednadžbi (6):

$$Udio\ ulja = \frac{m_3 - m_4}{m_5} \cdot 100 \quad (6)$$

gdje je:

m_3 – masa tikvice sa uljem (g),

m_4 – masa prazne tikvice (g),

m_5 – masa ispitivanog uzorka (g).

3.3.2. Priprema uzoraka za ekstrakciju superkritičnim CO₂

Sjemenke grožđa usitnjene su na laboratorijskom mlinu IKA A11 Basic. Nakon usitnjavanja sjemenki provedena je granulometrijska analiza na standardnoj seriji sita (Labortechnik GmbH, Ilmenau, Njemačka) (**Tablica 3**), te je određena prosječna veličina čestica uzorka. Na prethodno izvagana sita je preneseno 100 g usitnjenog zrna. Sita su postavljena tako da gornje sito ima najveće otvore, a zadnje sito je tzv. „slijepo sito“. Usitnjene sjemenke prosijane su u vremenu od 20 min te se potom svako pojedino sito ponovno vagalo. Maseni postotak svake frakcije i srednji promjer veličine otvora dva susjedna sita izračunao se iz izraza:

$$\frac{100}{d} = \sum \frac{m_i}{d_i} \quad (7)$$

gdje je:

m_i – maseni postotak frakcije,

d_i – srednji promjer i -te frakcije.

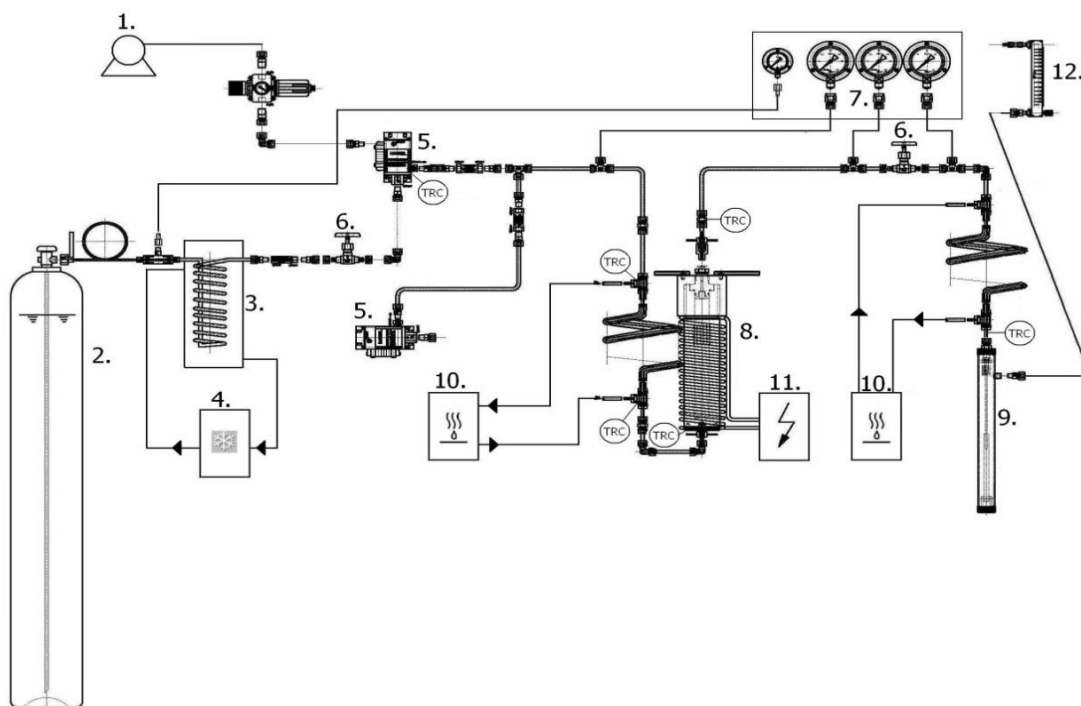
Određivanje veličine čestica provedeno je u dva ponavljanja.

Tablica 3 Oznaka i veličina otvora sita

BROJ SITA	Veličina otvora sita (mm)
0	2
1	1,4
2	0,8
3	0,63
4	0,5
5	0,4
6	0,315
7	0,2
8	0,1
9	0,05
10	0

3.3.3. Ekstrakcija ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO₂

Ekstrakcija je provedena u sustavu za SFE (**Slika 10** i **11**) čije je projektiranje i sama konstrukcija te izrada uređaja opisana u detalje u drugoj literaturi (Aladić, 2015; Jokić i sur., 2014b). 100 g usitnjenih sjemenki smješteno je u ekstrakcijsku kolonu. Ulje je skupljeno u prethodno izvagane staklene epruvete u separatoru. Svaki proces ekstrakcije trajao je 90 minuta. Izvagana je masa dobivenog ekstrakta nakon određenog vremena korištenjem vage preciznosti $\pm 0,0001$ g. Uvjeti u separatoru su bili 15 bara i 25 °C. SFE je provedena pri različitim vrijednostima tlaka i temperature definirane CCRD (centralno kompozitni rotacijski plan pokusa). Vrijeme ekstrakcije i brzina masenog protoka od $1,94 \text{ kg h}^{-1}$ držane su konstante tokom eksperimenta.



Slika 10 Procesna shema uređaja za ekstrakciju superkritičnim CO₂

1. Kompresor, 2. CO₂ spremnik, 3. Izmjenjivač topline od nehrđajućeg čelika, 4. Rashladna kupelj, 5. Zrakom pogonjena pumpa Haskel MS-71, 6. Ventili (B-HV), 7. Manometri, 8. Ekstraktor, 9. Separator, 10. Vodena kupelj, 11. Centralizirani sustav grijača od staklenih vlakana, 12. Mjerač protoka



Slika 11 Uređaj za superkritičnu ekstrakciju (Osijek, Hrvatska)

3.3.4. Optimiranje procesa ekstrakcije superkritičnim CO₂ primjenom metode odzivnih površina

U određivanju optimalnih vrijednosti tlaka (X_1) i temperature (X_2) za ekstrakciju ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO₂ odabran je centralno kompozitni rotacijski plan pokusa (CCRD), koji se sastoji od dvije varijable i pet razina faktora (Šumić i sur., 2015; Bas i Boyacı, 2007). U slučaju ovoga rada mijenjana su dva parametra (tlak i temperatura). Svaki parameter mijenja se na pet nivoa (+ α ; - α ; +1; -1; 0). Promatrani faktori i razine prikazani su

Tablici 4.

Tablica 4 Nekodirane i kodirane razine nezavisnih varijabli korištenih u RSM dizajnu

NEZAVISNE VARIJABLE	SIMBOLI	RAZINE				
		-1,414	-1	0	1	1,414
Tlak (bar)	X_1	158,6	200	300	400	441,4
Temperatura (°C)	X_2	35,9	40	50	60	64,1

Prema CCRD provedeno je 13 eksperimenata SFE (**Tablica 5**).

Tablica 5 Eksperimenti SFE ulja iz sjemenki grožđa definirani CCRD

BROJ EKSPERIMENTA	Tlak (bar)	Temperatura (°C)
1	300,00	64,14
2	300,00	50,00
3	200,00	60,00
4	400,00	60,00
5	441,42	50,00
6	400,00	40,00
7	300,00	35,86
8	300,00	50,00
9	300,00	50,00
10	300,00	50,00
11	300,00	50,00
12	158,58	50,00
13	200,00	40,00

Dobiveni eksperimentalni podaci su aproksimirani matematičkim modelom odzivnih površina, tj. polinomom drugog reda (8):

$$Y = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j \cdot X_j + \sum_{j=1}^k \beta_{jj} \cdot X_j^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} X_i X_j \quad (8)$$

gdje je Y modelom predviđena odzivna funkcija (prinos ulja i antioksidacijska aktivnost), β_0 je konstanta jednadžbe odzivnog polinoma, β_i i β_{ii} su linearni i kvadratni član jednadžbe odzivnog polinoma, β_{ij} je koeficijent člana interakcije jednadžbe odzivnog polinoma, a X_i i X_j kodirane nezavisne varijable (tlak ekstrakcije i temperature).

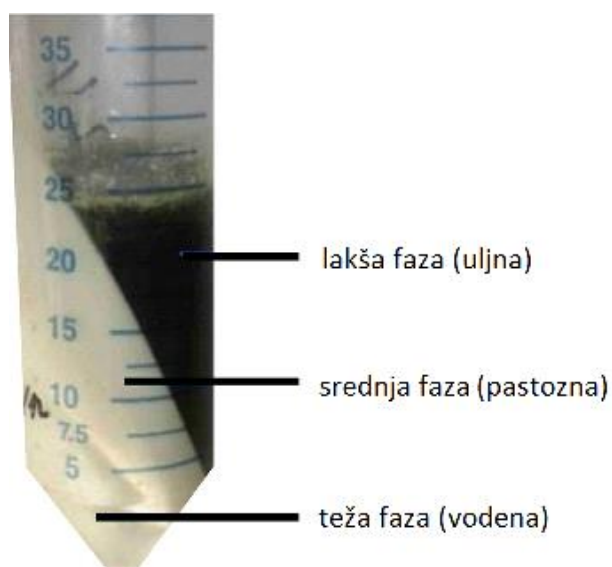
Statistička analiza provedena je primjenom softverskog paketa *Design-Expert*®, v.7 (Stat Ease, Minneapolis, USA). Rezultati su statistički testirani analizom varijance (ANOVA) na razini značajnosti od $p = 0,05$. Prihvatljivost modela procijenjena je koeficijentom determinacije (R^2) i modelom p -vrijednosti. Matematički modeli su postavljeni tako da opisuju utjecaj jednog parametra i/ili njihovu interakciju na više procesnih parametara na svakom ispitivanom odzivu.

3.3.5. Određivanje antioksidacijske aktivnosti

Antioksidacijska aktivnost ulja iz sjemenki grožđa određena je pomoću DPPH metode. Uzorci ulja sjemenki grožđa su centrifugirani pri čemu je dobiven trofazni sustav prikazan na **Slici 12**. Lakša (uljna) faza je odpipetirana u epruvete i otopljena u etil acetatu ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$), a 1,21 mL otopljenog uzorka pomiješalo se s 0,49 mL 0,3 mM otopinom DPPH radikala u etil acetatu. Sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja. Nakon inkubacije 30 min na sobnoj temperaturi izmjerena je apsorbancija pri $\lambda = 517 \text{ nm}$ i određena vezajuća aktivnost DPPH, prema izrazu (9):

$$\% \text{ DPPH aktivnost} = \frac{(A_{\text{DPPH}} + A_b) - A_s}{A_{\text{DPPH}}} \cdot 100 \quad (9)$$

gdje su A_{DPPH} – apsorbancija kontrole (umjesto uzorka, dodan je etil acetat), A_b – apsorbancija uzorka, gdje je umjesto DPPH dodan etil acetat, A_s – apsorbancija uzorka pomiješanog s otopinom DPPH.



Slika 12 Trofazni sustav nakon centrifugiranja ulja iz sjemenki grožđa dobivenog ekstrakcijom superkritičnog CO₂ (Rombaut i sur., 2014)

3.3.6. Određivanje tokoferola

Priprema uzoraka za GC-MS analizu provedena je saponifikacijom 0,5 g uzorka u 50 mL kalij hidroksida, a zatim postupcima ekstrakcije neosapunjive frakcije koristeći dietil eter kao ekstrakcijsko otapalo.

Analiza tokoferola provedena je metodom plinske kromatografije na plinskom kromatografu (Agilent 7890 A) s masenim detektorom (Agilent 5975 MSD). Za ovu analizu GC-MS je opremljen HP-5MS (Agilent J&W 19091S-433) kolonom (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm). Temperatura injektiranog uzorka je bila 250 °C. Temperatura mobilne faze bila je 280 °C, dok je temperatura kolone bila postavljena na 200 °C 3 min, nakon čega se je povećavala svake minute za 8 °C, sve do 280 °C. Kao plin nosioc korišten je helij, a MSD parametri su bili: scan (45 to 450 amu), threshold 100 MS, quad 150 °C, MS source 250 °C. Volumen injektiranja iznosio je 1 µL. Komponente su se analizirale i identificirale pri čemu je korištena biblioteka masenih spektara NIST (Nacionalni Institut za standarde i tehnologiju) 2008. Kvantitativna analiza je provedena metodom kalibracijske krivulje sa citiranim standardima. Analiza svakog ekstrakta provedena je u dva ponavljanja, a vrijednosti su prikazane kao aritmetičke sredine (Aladić, 2015).

4. REZULTATI

Tablica 6 Udio vlage i ulja u usitnjenoj sjemenki grožđa

MATRIKS	Udio vlage (%)	Udio ulja (%)
Sjemenka grožđa	9,38 ± 0,08	14,96 ± 0,28

Tablica 7 Prosječna veličina čestica u usitnjenim uzorcima sjemenki grožđa

BROJ SITA	Veličina otvora sita (mm)	1. uzorak (g)	2. uzorak (g)
0	2	0	0
1	1,4	9,35	9,73
2	0,8	8,84	9,17
3	0,63	18,18	17,74
4	0,5	16,39	15,11
5	0,4	8,92	9,71
6	0,315	9,97	9,96
7	0,2	9,72	14,91
8	0,1	14,64	12,19
9	0,05	3,07	1,44
10	0	0,01	0,05

Srednja veličina čestica izračunata prema izrazu (7) dobivena iz dva ponavljanja iznosi 0,380 ± 0,018 mm.



Slika 13 Fotografija sjemenki grožđa (lijevo), usitnjenih sjemenki grožđa (sredina) i sjemenki grožđa nakon ekstrakcije superkričnim CO₂ (desno)

Tablica 8 Prinos ulja i DPPH vrijednost dobivena primjenom različitih procesnih parametara ekstrakcije

BROJ EKSPERIMENTA	Tlak (bar)	Temperatura (°C)	Prinos (%)	DPPH (%)
1	300,00	64,14	11,0146	35,82
2	300,00	50,00	11,7897	35,15
3	200,00	60,00	4,8392	31,01
4	400,00	60,00	13,6893	32,11
5	441,42	50,00	14,8655	32,64
6	400,00	40,00	14,1655	36,4
7	300,00	35,86	11,6047	36,81
8	300,00	50,00	12,2258	35,01
9	300,00	50,00	12,234	37,06
10	300,00	50,00	12,0674	34,94
11	300,00	50,00	11,9762	33,58
12	158,58	50,00	2,5555	20,48
13	200,00	40,00	5,16649	24,48

Vrijeme ekstrakcije: 90 min; Protok CO₂: 1,94 kg/h



Slika 14 Fotografija ekstrahiranog ulja iz sjemenki grožđa



Slika 15 Fotografija ulja iz sjemenki grožđa dobivenog u različitim vremenskim intervalima tijekom ekstrakcije superkritičnim CO₂

Tablica 9 Odgovarajuće p -vrijednosti za odabrane odzivne varijable za svaki dobiveni koeficijent

ODZIV	Odsječak				
	X_1	X_2	X_1^2	X_2^2	X_1X_2
Prinos ulja	< 0,0001	0,1214	< 0,0001	0,0046	0,8273
DPPH	< 0,0001	0,8145	< 0,0001	0,3390	0,0030

X_1 : tlak ekstrakcije, X_2 : temperatura

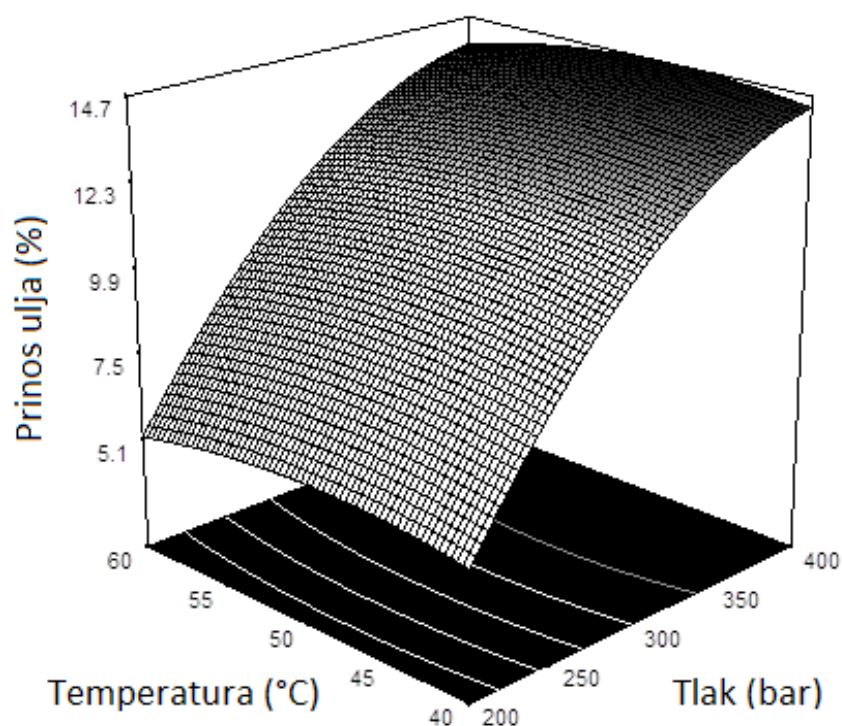
$p < 0,01$ velika značajnost; $0,01 \leq p < 0,05$ značajno; $p \geq 0,05$ nije značajno

Tablica 10 Analiza varijance (ANOVA) dobivenih vrijednosti promatranih odziva

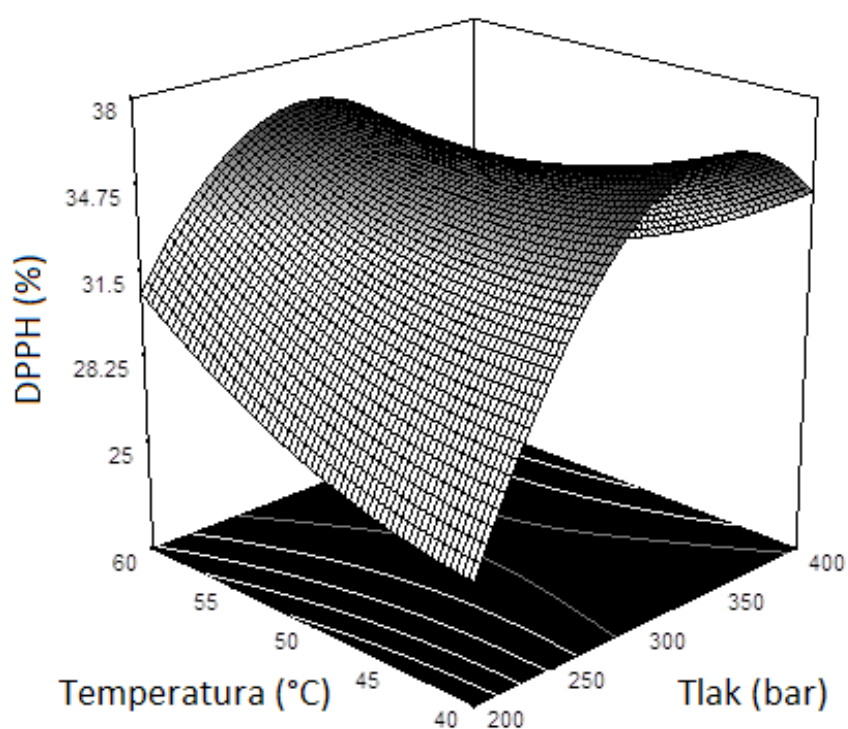
IZVOR VARIJABILNOSTI	SS	df	MS	F- vrijednost	p- vrijednost
Prinos ulja					
Model	179,06	5	35,81	331,52	< 0,0001
Ostatak	0,76	7	0,11		
Nedostatak modela	0,62	3	0,21	5,98	0,0584
Pogreška	0,14	4	0,034		
Ukupno	179,82	12			
$R^2 = 0,9958$					
DPPH					
Model	286,15	5	57,23	38,53	< 0,0001
Ostatak	10,4	7	1,49		
Nedostatak modela	4,22	3	1,41	0,91	0,511
Pogreška	6,18	4	1,54		
Ukupno	296,55	12			
$R^2 = 0,9649$					

SS – Suma kvadrata odstupanja podataka od početne vrijednosti; df – stupnjevi slobode; MS – varijanca;

Utjecaj faktora je statistički značajan uz $p \leq 0,05$



Slika 16 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine prinosa ulja u ovisnosti o tlaku i temperaturi ekstrakcije



Slika 17 Trodimenzionalni dijagram odzivne površine DPPH u ovisnosti o tlaku i temperaturi ekstrakcije

Tablica 11 Polinom jednadžbe drugog reda korišten za izražavanje predviđenih odziva (Y) kao funkcije nezavisnih varijabli (kodirane vrijednosti)

ODZIV	Polinom jednadžbe drugog reda	Eq.
Prinos ulja	$Y_1 = 12.06 + 4.41X_1 - 0.20X_2 - 1.81X_1^2 - 0.51X_2^2 - 0.037X_1X_2$	(10)
DPPH	$Y_2 = 35.15 + 2.01X_1 + 0.10X_2 - 6.28X_1^2 + 1.10X_2^2 - 2.70X_1X_2$	(11)

X_1 : tlak ekstrakcije, X_2 : temperatura

Tablica 12 Optimalni procesni parametri ekstrakcije superkritičnim CO₂ ulja iz sjemenki grožđa i izračunati promatrani odzivi

PROCESNI PARAMETRI	Udio ulja (%)	DPPH (%)
Tlak = 400 bar	14,49	37,06
Temperatura = 41 °C		

Vrijeme ekstrakcije: 90 min; Protok CO₂: 1,94 kg/h

Tablica 13 Sadržaj α -tokoferola u grožđanom ulju dobivenom pri optimalnim uvjetima ekstrakcije iz **Tablice 12**

SADRŽAJ	
α -tokoferol (mgkg ⁻¹)	36,05

5. RASPRAVA

Ekstrakcija ulja iz sjemenki grožđa izvršena je pomoću superkritičnog CO₂. Prije ekstrakcije, sjemenke su usitnjene kako bi se poboljšao proces ekstrakcije te je određen početni sadržaj vlage i ulja. Prosječni sadržaj vlage iznosio je $9,38 \pm 0,08$ %, a prosječni sadržaj ulja $14,96 \pm 0,28$ % što je u skladu s dobivenim rezultatima drugih autora (Passos i sur., 2009; Crews i sur., 2006; Baydar i sur., 2001). Prosječna veličina čestica usitnjenih sjemenki grožđa pripremljenih za ekstrakciju iznosila je $0,380 \pm 0,018$ mm.

Plan pokusa SFE u ovoj istraživanju sadrži 13 eksperimenata, koji su provedeni prema danim parametrima u **Tablici 8**. Utjecaj tlaka i temperature na prinos ulja iz sjemenki grožđa i njegovu antioksidacijsku aktivnost proučeni su pomoću RSM. Ova dva ispitana procesna parametra su ključna za SFE, budući da oni određuju gustoću otapala. Gustoća CO₂ se mijenja u ovisnosti o temperaturi i tlaku. U kritičnom području, malene promjene tlaka i/ili temperature mogu znatno utjecati na gustoću CO₂ čime dolazi do promjene snage otapanja. Općenito, povećanje gustoće otapala omogućuje povećanje prinosa dobivenih ekstrakata. Nadalje, koncentracija otopljene supstance u superkritičnom stanju ovisi i od njezine isparljivosti, te su hlapivi spojevi i oni niže molekularne mase topljiviji u superkritičnom CO₂ (Cvjetko-Bubalo i sur., 2015).

Iz **Tablice 8** može se vidjeti da je ekstrakcija ulja iz sjemenki grožđa pri konstantnim parametrima vremena i protoka otapala bila u rasponu od 2,56 do 14,87 %, ovisno o primijenjenom tlaku i temperaturi ekstrakcije. Nadalje, uspoređujući prinos ulja dobiven metodom po Soxhletu (14,96 %) i metodom ekstrakcije pomoću superkritičnog CO₂ (14,87 %), očito je da se ulje iz sjemenki grožđa može u potpunosti ekstrahirati superkritičnim CO₂, ukoliko se primjenjuju odgovarajući uvjeti ekstrakcije. U usporedbi s tradicionalnom ekstrakcijom, koristeći superkritični CO₂, faze destilacije otapala i rafinacije ulja se mogu izostaviti (Molero Gomez i sur., 1996). Također, Rombaut i sur. (2014) su dokazali da ulje sjemenki grožđa dobiveno primjenom supekritičnog CO₂ sadrži veću količinu polifenola, nego ulje dobiveno mehaničkim prešanjem. Ekstrahirano ulje sjemenki grožđa imalo je zeleno žutu boju s karakterističnim mirisom i može se dodatno koristiti ne samo kao dijetetski proizvod, nego i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Bravi i sur., 2007; Fernandes i sur., 2013). Druga vrlo važna prednost ove zelene tehnologije je što odmašćeni kolač koji zaostaje nakon SFE ne sadrži toksična otapala, za razliku od ekstrakcije organskim otapalima, gdje prisutnost tragova organskog otapala u konačnom proizvodu čini proces ekstrakcije manje poželjnim s

zdravstvenog i ekološkog gledišta. Takav odmašćeni kolač, zaostao nakon ekstrakcije superkritičnim CO₂ može se dalje upotrijebiti u druge svrhe, primjerice u razvoju novih funkcionalnih proizvoda, jer zaostaju velike količine fenolnih spojeva u kolaču (Jokić i sur., 2014b).

Poznato je da tokoferoli i fenolni spojevi imaju veliki utjecaj na antioksidacijsku aktivnost te da je ulje sjemenki grožđa dokazano bogato vitaminom E (Fernandes i sur., 2013). Antioksidacijska aktivnost groždanog ulja, izražena kao DPPH prikazana u **Tablici 8**, je vjerojatno povezana sa sadržajem tokoferola, što je objašnjeno u daljnjem tekstu. Utjecaj tlaka na antioksidacijsko djelovanje, primjerice na koncentraciju bioaktivnih spojeva koji djeluju kao antioksidansi je značajna. Groždano ulje ekstrahirano pri višem tlaku ima veću antioksidacijsku aktivnost, što je u korelaciji s objavljenim rezultatima Passos i sur. (2010). Isti su autori također otkrili kako temperatura može utjecati na topljivost tokoferola i samim time i na antioksidacijsko djelovanje. U ovom radu, taj je učinak najistaknutiji pri tlaku od 200 bara.

Tablica 9 pokazuje da linearni izraz tlaka ekstrakcije (X_1), kao i njegov kvadratni izraz (X_1^2) imaju statistički značajan utjecaj na prinos ekstrakcije ulja i njegovu antioksidacijsku aktivnost ($p < 0,0001$). Duba i Fiori (2015) dobili su slične rezultate o utjecaju glavnih procesnih varijabli na ekstrakciju ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO₂. Povećanje radnog tlaka ima pozitivan učinak na prinos ekstrakcije. Razlog je taj što povećanje tlaka (pri konstantnoj temperaturi) povećava gustoću superkritičnog CO₂, a samim time i snagu otapala. Nadalje, interakcija između tlaka ekstrakcije i temperature (X_1X_2) ima značajan utjecaj samo na DPPH vrijednost ($p = 0,0030$). Najbolji način prikazivanja utjecaja parametara procesa ekstrakcije na prinos ulja i njegovu antioksidacijsku aktivnost unutar istraživanog eksperimentalnog područja je kreiranjem modela odzivne površine. Odzivna ploha (**Slika 16**) pokazuje da se prinos ulja povećava povećanjem tlaka ekstrakcije, dok temperatura nema značajan utjecaj na prinos ulja. U slučaju antioksidacijskog djelovanja (**Slika 17**) dobivenog groždanog ulja, vidljivo je kako se DPPH vrijednost povećava povećanjem temperature ekstrakcije. Također, antioksidacijsko djelovanje se značajno povećalo povećanjem tlaka do otprilike 350 bara. Daljni porast tlaka doveo je do blagog smanjenja DPPH vrijednosti.

Odzivna površina stvorena je na temelju jednadžbi drugog reda (10 i 11):

$$Y_1 = 12,06 + 4,41X_1 - 0,20X_2 - 1,81X_1^2 - 0,51X_2^2 - 0,037X_1X_2 \quad (10)$$

$$Y_2 = 35,15 + 3,78X_1 + 0,10X_2 - 4,40X_1^2 + 0,40X_2^2 - 2,70X_1X_2 \quad (11)$$

gdje su Y_1 i Y_2 prinos ekstrakcije i DPPH vrijednost, X_1 tlak ekstrakcije i X_2 temperatura ekstrakcije prikazana u kodiranim vrijednostima.

ANOVA rezultati odzivnih modela prikazani su u **Tablici 10** (F -test i test vjerojatnosti). Joglekar i May (1987) predložili su da za dobro podešavanje modela R^2 treba biti najmanje 0,80. U ovom radu, R^2 vrijednost za ekstrakciju ulja iznosila je 0,99, a za antioksidacijsko djelovanje 0,96, što pokazuje da su dobiveni regresijski modeli zadovoljavajući. Kada su vrijednosti " $Prob > F$ " za određene članove odzivnog polinoma manje od 0,05 (p -vrijednost) onda su ti članovi značajni. Vjerojatnost (p -vrijednost) oba regresijska modela je $< 0,0001$, što znači da postoji statistički značajan utjecaj između nezavisnih varijabli i varijabli promatranih odziva. Pored toga statistički parametar "nedostatak modela" (engl. *Lack of fit*) nije bio statistički značajan za $p < 0,05$.

Konačni cilj RSM je process optimizacije. Dakle, razvijeni modeli mogu se koristiti za simulaciju i optimizaciju. Optimizacija je važan alat u prehrambenom inženjerstvu za učinkovit rad različitih procesa kako bi se dobio prihvatljiv proizvod (Šumić i sur., 2015; Jokić i sur., 2012; Cvjetko i sur., 2012; Jokić i sur., 2010). U ovom radu za izračun su predloženi sljedeći uvjeti optimizacije: maksimalni prinos ulja i maksimalno antioksidacijsko djelovanje. Cilj ovog istraživanja bio je pronaći najbolje procesne parametre ekstrakcije superkritičnim CO_2 za groždano ulje. Za optimiranje procesa najčešće se primjenjuje metoda temeljena na konceptu željene funkcije (engl. *Desirability function*, D). Optimiranje se provodi na način da se praćeni odzivi (y) prevode u individualne željene funkcije čije se vrijednosti kreću 0 - 1. Vrijednost individualne željene funkcije 0 predstavlja najlošiju, odnosno 1, najbolju vrijednost za promatrani odziv. Ukupna željena funkcija (D) jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija. Primjenom metode temeljene na konceptu željene funkcije (Cojocar i sur., 2009), dobiveni su optimalni uvjeti ekstrakcije: tlak ekstrakcije od 400 bara i temperatura od 41 °C. Pri tim optimalnim uvjetima, izračunati prinos ulja iznosi 14,49 %, a vrijednost DPPH 37,06 %, što se izvrsno slaže s dobivenim eksperimentalnim podacima. Ulje

iz sjemenki grožđa dobiveno pri optimalnim uvjetima ekstrakcije analizirano je pomoću metode plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC/MS) u cilju određivanja tokoferola. Analizirano ulje imalo je sadržaj α -tokoferola od 36,05 mgkg⁻¹. Slične rezultate o količini α -tokoferola objavili su Šeker i sur. (2012). Zaključili su kako je moguće primjenom superkritičnog CO₂ dobiti groždano ulje bogato α -tokoferolom, što su isto tako utvrdili i Bravi i sur. (2007). Agostini i sur. (2012) su zaključili da superkritični CO₂ ima mnoge prednosti u odnosu na tradicionalne tipove ekstrakcije (Soxhlet s organskim otapalom, mehaničko prešanje). U usporedbi s rezultatima dobivenim u radu Šekera i sur. (2012) i rezultatima u ovom radu, Agostini i sur. (2012) su dobili mnogo manji udio α -tokoferola u groždanom ulju.

Ovo istraživanje pokazuje odličnu mogućnost korištenja SFE u proizvodnji ulja iz sjemenki grožđa, a ako se podvlače paralele s međunarodnim interesom obzirom na obujam svjetske proizvodnje komine, cijenom industrijskih postrojenja i prihoda povezanih sa superkritičnom tehnologijom (Fiori, 2010), razlika između troškova proizvodnje i maloprodajne cijene je dovoljna da se superkritični proces učini ekonomski povoljnim, naročito zbog sličnosti u kvaliteti groždanog ulja dobivenog metodom hladnog prešanja.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Ispitivane sjemenke grožđa sadrže $9,38 \pm 0,08$ % vlage i $14,96 \pm 0,28$ % ulja,
2. Metoda odzivnih površina je uspješno primjenjena za optimizaciju procesa ekstrakcije ulja iz sjemenki grožđa pomoću superkritičnog CO₂. Visoka korelacija dobivenih matematičkih modela pokazuje da se model kvadratnog polinoma može koristiti za optimizaciju prinosa ekstrakcije, kao i antioksidacijsko djelovanje dobivenog groždanog ulja,
3. Optimalni uvjeti ekstrakcije superkritičnim CO₂ pri kojima je dobiven najveći prinos ulja i najveća vrijednost DPPH određeni metodom odzivnih površina su sljedeći: tlak ekstrakcije 400 bara i temperatura 41 °C (uz konstatno vrijeme ekstrakcije 90 min i protok CO₂ 1,94 kg h⁻¹),
4. Prema statističkoj značajnosti (ANOVA) utjecaja različitih procesnih uvjeta na ekstrakciju ulja iz sjemenki grožđa superkritičnim CO₂ vidljivo je da je tlak ekstrakcije imao najveći utjecaj na prinos ulja i njegovu antioksidacijsku aktivnost, jer povećanjem tlaka (pri konstantnoj temperaturi) dolazi do povećanja gustoće superkritičnog CO₂ čime se povećava snaga otapala. Temperatura nije imala statistički značajan utjecaj na prinos ulja, dok u slučaju antioksidacijskog djelovanja povećanjem temperature dolazi do povećanja DPPH vrijednosti. Interakcija tlaka ekstrakcije i temperature ima statistički značajan utjecaj na DPPH vrijednost.
5. Primjenom ekstrakcije pomoću superkritičnog CO₂ može se potpuno ekstrahirati ulje iz sjemenki grožđa što je od velikog značaja u industrijskim procesima, jer se ostvaruju minimalni gubici u proizvodnom procesu uz gotovo potpuno iskorištenje polazne sirovine,
6. Pri optimalnim uvjetima ekstrakcije superkritičnim CO₂ dobiveno je groždano ulje sa udjelom α -tokoferola 36,05 mg kg⁻¹,
7. Ekstrahirano ulje iz sjemenki grožđa pomoću superkritičnog CO₂ bogato je vitaminom E i može se koristiti kao dijetetski proizvod, kao i u druge svrhe. Nadalje, odmašćeno groždano brašno koja nastaje kao nusproizvod superkritične ekstrakcije može se

koristiti i za druge namjene (u proizvodnji obogaćenih ekstrudiranih proizvoda, pekarskoj industriji itd.) Ovo istraživanje je vrlo značajno jer daje u uvid mogućnost iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije pa tako i nusproizvoda proizvodnje vina. Time je proces proizvodnje hrane zaokružen i ne stvara se velika količina organskog otpada koji danas predstavlja ogroman ekološki i financijski teret u gotovo svim granama prehrambene industrije.

7. LITERATURA

- Abbas KA, Mohamed A, Abdulamir AS, Abas HAA: Review on supercritical fluid extraction as new analytical method. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4:345-353, 2008.
- Acworth IN: *The Handbook of Redox Biochemistry*. Eds. ESA, Inc. Chelmsford, USA, 2003.
- Agostini F, Bertussi RA, Agostini G, Atti Dos Santos AC, Rossato M, Vanderlinde R: Supercritical extraction from vinification residues: fatty acids, α -tocopherol, and phenolic compounds in the oil seeds from different varieties of grape. *The Scientific World Journal* DOI: 10.1100/2012/790486, 2012.
- Ahmed J, Rahman MS: *Handbook of Food Process Design*. Wiley-Blackwell, Chichester, 2012.
- Aladić K: Optimizacija procesa ekstrakcije konopljinog (*Cannabis Sativa* L.) ulja superkritičnim CO₂ iz pogače nakon hladnog prešanja. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Aladić K, Jokić S, Moslavac T, Tomas S, Vidović S, Vladić J, Šubarić D: Cold pressing and supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil. *Chemical and biochemical engineering quartely* 28:1-10, 2014.
- Arvanitoyannis IS, Ladas D, Mavromatis A: Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *Internation Journal of Food Science and Technology* 41:475-487, 2006.
- Bail S, Stuebiger G, Krist S, Unterweger H, Buchbauer G: Characterization of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry* 108:1122-1132, 2008.
- Barron LJR, Celaa MV, Santa-Maria G, Corzo N: Determination of the Triglyceride Composition of Grapes by HPLC. *Chromatographia* 25:609-612, 1988.
- Bas D, Boyacı IH: Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78:836-845, 2007.
- Baydar NG, Akkur M: Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 25:163-168, 2001.
- Beverigde THJ, Girard B, Kopp T, Drover JCG: Yield and composition of grape seed oils extracted by supercritical carbon dioxide and petroleum ether: Varietal effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1799-1804, 2005.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escaleira LA: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76:965-977, 2008.
- Bondet V, Brand-Williams W, Berset C: Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH* free radical method. *LWT – Food Science and Technology* 30:609-615, 1997.

- Bourzeix MD, Weyland D, Heredia N: Étude des catébins et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull. O. I. V.* 669-670: 1171-1254, 1986.
- Bradley N: The Response Surface Methodology. *Master of Science*. Indiana University of South Bend, South Bend, IN, 2007.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology* 28:25-30, 1995.
- Bravi M, Spinoglio F, Verdone N, Adami M, Aliboni A, D'Andrea A, De Santis A, Ferri D: Improving the extraction of α -tocopherol-enriched oil from grape seeds by supercritical CO₂. Optimisation of the extraction conditions. *Journal of Food Engineering* 78:488-493, 2007.
- Brckan J, Katić M: Utjecaj parametara proizvodnje na kemijski sastav nerafiniranih ulja konoplje. *Rad za rektorovu nagradu*, Zagreb, 2013.
- Brunner G: Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*. 67:21-33, 2005.
- Cajner H: Višekriterijsko adaptivno oblikovanje planova pokusa. *Doktorski rad*. Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb, 2011.
- Capuzzo A, Maffei ME, Occhipinti A: Supercritical Fluid Extraction of Plant Flavors and Fragrances. *Molecules* 18:7194-7238, 2013.
- Cojocar C, Khayet M, Zakrzewska-Trznadel G, Jaworska A: Modeling and multi-response optimization of pervaporation of organic aqueous solutions using desirability function approach. *Journal of Hazardous Materials* 167:52-63, 2009.
- Crews C, Hough P, Godward J, Brereton P, Lees M, Guet S, Winkelmann W: Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:6261-6265, 2006.
- Cvjetko Bubalo M, Vidović S, Radojčić Redovniković I, Jokić S: Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 90:1631-1639, 2015.
- Cvjetko M, Jokić S, Lepojević Ž, Vidović S, Marić B, Radojčić Redovniković I: Optimization of the supercritical CO₂ extraction of oil from rapeseed using response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology* 50:208-215, 2012.
- Demirbas A: Supercritical fluid extraction and chemicals from biomass with supercritical fluids. *Energy Conversion & Management* 42:279-294, 2001.
- De Magalhães LMA: Development of automatic methods based on flow techniques for evaluation of antioxidant capacity in pharmaceutical and food products. *Degree of PhD*. Faculdade de Farmacia, Porto, 2007.
- Duba KS, Fiori L: Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. *Journal of Supercritical Fluids* 98:33-43, 2015.

- El-kassas FB, Ali AM, Mostafa SE: Phenolic compounds as antioxidants of some products manufactured from two cultivated Egyptian varieties of seedless grapes. *Annals of Agricultural Science* 59:195-199, 2014.
- Escribano-Bailón MT, Guitiérrez-Fernández Y, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C: Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 40:1794-1799, 1992.
- Escribano-Bailón MT, Guerra MT, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C: Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*. 200:221-224, 1995.
- Fernandes L, Casal S, Cruz R, Pereira JA, Ramalhosa E: Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International* 50:161-166, 2013.
- Fiori L: Supercritical extraction of grape seed oil at industrial-scale: Plant and process design, modeling, economic feasibility. *Chemical Engineering and Processing* 49:866-872, 2010.
- Fuleki T, Ricardo da Silva JM: Catechin and procyanidin composition of seeds from grape cultivars grown in Ontario. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 45:1156-1160, 1997.
- Gacche RN, Shete AM, Dhole NA, Ghole VS: Reversible inhibition of polyphenol oxidase from apple using L-cysteine. *Indian Journal of Chemical Technology* 13:459-463, 2006.
- Gliszczyńska-Świgło A, Sikorska E, Khmelinskii I, Sikorski M: Tocopherol content in edible oil plant oils. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 57:157-161, 2007.
- Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL: High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 46:1887-1892, 1998.
- Halliwell B, Gutteridge JMC: *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Ed., Clarendon, Oxford, UK, 1989.
- Joglekar AM, May AT: Product excellence through design of experiments. *Cereal Foods World* 32:857-868, 1987.
- Jokić S: Matematičko modeliranje ekstrakcije ulja iz zrna soje superkritičnim CO₂. *Doktorska disertacija*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2011.
- Jokić S, Cvjetko M, Božić Đ, Fabek S, Toth N, Vorkapić-Furač J, Radojčić Redovniković I: Optimized microwave-assisted extraction of phenolic compounds from broccoli and its antioxidant activity. *International Journal of Food Science and Technology*, 47:2613-2619, 2012.

- Jokić S, Horvat G, Aladić K: Design of SFE system using a holistic approach – problems and challenges. U *Supercritical Fluid Extraction: Technology, Applications and Limitations*, str. 95-122. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, 2014a
- Jokić S, Vidović S, Adalić K: Supercritical Fluid Extraction of Edible Oils. U *Supercritical Fluids: Fundamentals, Properties and Applications*, str. 205-228. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, 2014b.
- Jokić S, Zeković Z, Vidović S, Sudar R, Nemet I, Bilić M, Velić D: Supercritical CO₂ extraction of soybean oil: process optimization and triacylglycerol composition. *International Journal of Food Science & Technology* 45:1939-1946, 2010.
- Jordão AM, Ricardo Da Silva JM, Laureano O: Evolution of proanthocyanidins in bunch stems during berry development (*Vitis Vinifera* L.). *Vitis* 40:17-22, 2001.
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LA: The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 7:671-701, 1996.
- Litwinienko G, Ingold KU: Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl (dpph*) in alcohols *The Journal of Organic Chemistry* 68:3433-3438, 2003.
- Liyana-Pathirana C, Shahidi F: Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. *Food Chemistry* 93:47-56, 2005.
- Lovrić T: Procesi u prehrambenoj industriji s osnovama prehrambenog inženjerstva. Hinus, Zagreb, 2003.
- Madamba PS: The response surface methodology: an application to optimize dehydration operations of selected agricultural crops. *Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie* 35:584-592, 2002.
- Mateljan G: The World's Healthiest Foods: Essential Guide for the Healthiest Way of Eating. World's Healthiest Foods, New York, USA, 2007.
- Mattick LR, Rice AC: Fatty acid composition of grapeseed oil from native american and hibrid grape varieties. *American Journal of Enology Viticulture* 27:88-90, 1976.
- Molero Gomez A, Pereyra E, de la Ossa EM: Recovery of grape seed oil by liquid supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with convention solvent extraction. *Chemical Engineering Journal* 61:227-231, 1996.
- Molyneux P: The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 26:211-219, 2004.
- Moslavac T, Jokić S, Šubarić D, Aladić K, Vukoja J, Prce N: Pressing and supercritical CO₂ extraction of *Camelina sativa* oil. *Industrial Crops and Products* 54:122-129, 2014.

- Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Sineiro J, Domínguez H, Núñez MJ, Parajó JC. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* 72:145-171, 2001.
- Murga R, Ruiz R, Beltrán S, Cabezas JL: Extraction of Natural Complex Phenols and Tannins from Grape Seeds by Using Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and Alcohol. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 48:3408-3412, 2000.
- Myers RH, Montgomery DC: *Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. John Wiley & Sons, New York, NY, 1995.
- Ohnishi M, Hirose S, Kawaguchi M, Ito S, Fujino Y: Chemical Composition of Lipids. Especially Triacylglycerol, in Grape Seeds. *Agricultural and Biological Chemistry* 54:1035-1042, 1990.
- Palma M, Taylor LT, Varela RM, Cutler SJ, Cutler HG: Fractional Extraction of Compounds from Grape Seeds by Supercritical Fluid Extraction and Analysis for Antimicrobial and Agrochemical Activities. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 47:5044-5048, 1999.
- Passos CP, Silva RM, Da Silva FA, Coimbra MA, Silva CM: Enhancement of the supercritical fluid extraction of grape seed oil by using enzymatically pre-treated seed. *The Journal of Supercritical Fluids* 160:634-640, 2008.
- Passos CP, Silva RM, Da Silva FA, Coimbra MA, Silva CM: Supercritical fluid extraction of grape seed (*Vitis Vinifera* L.) oil. Effect of the operating conditions upon oil composition and antioxidant capacity. *Chemical Engineering Journal* 160:634-640, 2010.
- Passos CP, Yilmaz S, Silva CM, Coimbra MA: Enhancement of grape seed oil extraction using a cell wall degrading enzyme cocktail. *Food Chemistry* 115:48-53, 2009.
- Popa VM: *Posibilitati de obținere, caracterizare și valorificare a unor fracții lipidice din subproduse de procesare horticolă*. Rezumat teză de doctorat, Editura Eurobit, Timișoara, 2009.
- Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M: Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 36:781-784, 1994.
- Ricardo da Silva JM, Rigaud J, Cheynier V, Cheminat A, Moutounet M: Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* 30:1259-1264. 1991.
- Ricardo da Silva JM, Rosec JPh, Bourzeix M, Mourgues J, Moutounet M: Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvèdre grapes and red wines. *Vitis* 31:55-63, 1992.
- Rombaut N, Savoie R, Thomasset B, Bélliard T, Castello J, Van Hecke É, Lanoisellé J-L: Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Comptes Rendus Chimie* 17:284-294, 2014.

- Rot T: Optimizacija procesa proizvodnje lješnjakovog ulja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2015.
- Şeker ME, Çelik A, Dost K: Determination of vitamin E isomers of grape seeds by high-performance liquid chromatography-UV detection. *Journal of Chromatographic Science* 50:97-101, 2012.
- Sabir A, Unver A, Kara Z: The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *Journal of the science of food and agriculture* 92:1982-1987, 2012.
- Schieber A, Stintzing FC, Carle R: By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments. *Trends in Food Science & Technology*. 12:401-413, 2001.
- Schwartz H, Ollilainen V, Piironen V, Lampi AM: Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis* 21:152-161, 2008.
- Sharif KM, Rahman MM, Azmir J, Mohamed A, Jahurul MHA, Sahena F, Zaidul ISM: Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. *Journal of Food Engineering* 124:105-116, 2014.
- Sousa EC, Uchôa-Thomaz AMA, Carioca JOB, de Morais SM, de Lima A, Martins CG, Alexandrino CD, Ferreira PAT, Rodrigues ALM, Rodrigues SP, Silva JN, Rodrigues LL: Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis Vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology* 34:135-142, 2014.
- Souquet JM, Cheynier V, Brossaud F, Moutounet M: Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 46:509-512, 1996.
- Šumić Z, Tepić A, Jokić S, Malbaša R: Optimization of frozen wild blueberry vacuum drying process. *Hemijska industrija* 69:77-84, 2015.
- Temelli F: Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *Journal of Supercritical Fluids* 47:583-590, 2009.
- Tipsrisukond N, Fernando LN, Clarke AD: Antioxidant Effects of Essential Oil and Oleorisin of Black Pepper from Supercritical Carbon Dioxide Extractions in Ground Pork. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 46:4329-4333, 1998.
- Yanishlieva-Maslarova NV: Inhibiting oxidation. U *Antioxidants in food*, str. 23-70. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2001.
- Yeo JD, Jeong MK, Park CU, Lee JH: Comparing Antioxidant Effectiveness of Natural and Synthetic Free Radical Scavengers in Thermally-Oxidized Lard using DPPH Method. *Journal of Food Science* 75:258-262, 2010.
- Zoričić: *Podrumarstvo*. Nakladni zavod Globus, Zagreb, 1996.

Živković D, Gabrić I, Šitić S: Utjecaj niskog i visokog popuštanja na tvrdoću čelika EN 42CRMO4. *Tehnički glasnik* 6:171-177, 2012.